REGIS EDGAR CASTILHO JUNIOR

Detecção molecular de *Mollicutes* em caprinos do sudoeste da Bahia, Brasil:
um estudo transversal.

São Paulo

2017

REGIS EDGAR CASTILHO JUNIOR

Deteccção molecular de *Mollicutes* em caprinos do sudoeste da Bahia, Brasil: um estudo transversal.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Área de concentração:

Epidemiologia Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Benites

De acordo: _____
Orientador

São Paulo

2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3494
FMVZ

Castilho Junior, Regis Edgar

Detecção molecular de *Mollicutes* em caprinos do sudoeste da Bahia, Brasil:
um estudo transversal / Regis Edgar Castilho Junior. -- 2017.
83 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Micoplasmas. 2. *Mycoplasma conjunctivae*. 3. Epidemiologia. 4. Caprinos.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Detecção Molecular de Mollicutes em caprinos do sudoeste da Bahia, Brasil: Um estudo transversal.", protocolada sob o CEUA nº 8445300117, sob a responsabilidade de **Nilson Roberti Benites** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 10/02/2017.

We certify that the proposal "Molecular Detection of Mollicutes in Goats from Southwest of Bahia, Brazil: A cross sectional study.", utilizing 132 Caprines (males and females), protocol number CEUA 8445300117, under the responsibility of **Nilson Roberti Benites** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/10/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 02/2015 a 03/2017

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Animais provenientes de outros projetos**

Espécie: **Caprinos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 6 anos**

N: **132**

Linhagem: **SRD**

Peso: **20 a 60 kg**

Resumo: Devido à adaptabilidade dos animais aos diferentes ecossistemas, além da produção de leite e carne, a caprinocultura se consolidou como uma atividade de extrema importância cultural, social e econômica. Os principais estados do Brasil relacionados com a caprinocultura encontram-se na região nordeste, contribuindo com mais de 90% da criação do país, sendo assim, os cuidados sanitários e de manejo dessas criações são essenciais para que se minimizem as perdas econômicas. As micoplasmoses, como são conhecidas as doenças causadas pelos microrganismos da Classe Mollicutes, representam um grande problema socioeconômico, principalmente em regiões que dependem desses animais como fonte de renda. Com isso, o presente projeto consiste na aplicação de questionários, coleta de amostras de swab de conjuntiva ocular, nasal e vaginal, bem como, análise por PCR e qPCR dos micro-organismos da Classe Mollicutes de interesse na caprinocultura.

Local do experimento: Propriedades rurais nas cidades de Vitória da Conquista, Itapetinga, Brumado, Anagé e Bom Jesus da Serra

São Paulo, 14 de março de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CASTILHO JUNIOR, Regis Edgar

Título: **Detecção molecular de *Mollicutes* em caprinos do sudoeste da Bahia, Brasil: um estudo transversal.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Epidemiologia
Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Este trabalho é dedicado integralmente a Deus e minha família
que me fortalecem e me fazem seguir sempre em frente.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas, a oportunidade de me tornar mestre e ao foco e dedicação que me concedeu para a realização desse projeto.

Aos meus amados pais, Regis e Sylmara, exemplos de caráter e dedicação, pelo apoio incondicional, por acreditarem em meu potencial, e serem os pilares que me mantiveram firme e forte durante todo o percurso.

Ao meu falecido tio Rogério, pela presença durante minha infância moldando meu caráter positivo e questionador, me ensinando entre outras coisas o respeito pela família.

Aos meus falecidos avós, Wilma e Renato, pelo exemplo de positividade e fraternidade familiar, pela proteção e intercessão divina de meus pedidos junto a Deus.

Aos meus avós, Ruth e Edgar, pelo carinho dedicado, por acreditarem mais em mim do que eu mesmo, pelos conselhos, ensinamentos e incentivo de sempre.

A minha esposa, Thabata, pelos 13 anos de amor e carinho, por suportar as fases mais difíceis e ser meu norte, me dando o suporte emocional necessário, mas principalmente pelo companheirismo e dedicação a nosso relacionamento.

Ao meu irmão Denis, parceiro de toda a vida, pelo incentivo, o ouvido nos dias de desabafo e as sessões de relaxamento nas aulas de Muay Thai.

A minha família inteira, por todos os momentos de carinho, suporte e alegrias que formaram meu caráter e fizeram me tornar a pessoa que hoje sou.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nilson Benites, por me aceitar como seu aluno e todos os ensinamentos e atenção dispensada.

Aos meus tutores, Prof. Dr. Jorge Timenetsky e Prof. Dr. Lucas Marques, pela orientação, direcionamento e dedicação. Por me auxiliarem em meu amadurecimento acadêmico essencial nessa fase de minha vida.

Aos colegas de USP, Natalia, Aline, Verena, Guilherme, Cristina, Izadora, Camila, Maysa e Ana Márcia por terem me recebido tão bem, pela família formada no laboratório e por todo suporte intelectual e principalmente emocional.

A minha “mãezinha” de laboratório, Celminha, por ser o ombro amigo quando precisamos de uma palavra de conforto ou apenas no desabafo tantas vezes necessário.

A colega Fernanda, pelo auxílio e apoio no setor burocrático mais que essenciais em um momento tão turbulento do mestrado e consequentemente de minha vida.

Ao colega Carlos, pela coleta das amostras que me permitiram realizar esse projeto tão importante para meu crescimento pessoal e profissional.

À todos meus amigos mais próximos, aqueles que não preciso citar para que saibam que essa frase se destina a eles, por me permitirem os momentos de tranquilidade e descontração tão importantes durante o mestrado.

A Prof. Dr. Lilian Gregory pela indicação à realização desse projeto.

Ao Danival, muito mais que “apenas” o secretário do VPS, um amigo, por todo o auxílio, atenção e paciência dispensada a mim.

A todos meus professores que me ajudaram a amadurecer pessoalmente e academicamente, me apresentando uma profissão na qual será uma honra um dia me tornar um de vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

RESUMO

CASTILHO JUNIOR, R. E. **Deteção molecular de *Mollicutes* em caprinos do sudoeste da Bahia, Brasil: um estudo transversal.** [Molecular detection of *Mollicutes* in goats from southwest of Bahia, Brazil: a cross sectional study.]. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O Brasil possui cerca de 8,6 milhões de caprinos e mais de 90% estão localizados na região nordeste do país. A caprinocultura, devido sua grande adaptabilidade ao diferentes ecossistemas, possui importância social e econômica na região. Nesse contexto inserem-se os micoplasmas que colonizam os caprinos. As micoplasmoses caprinas são amplamente disseminadas mundialmente e possuem relevância socioeconômica na sua criação. A baixa tecnificação das propriedades, falhas na detecção de *Mollicutes* e a baixa produção científica demonstram um cenário preocupante quanto à sanidade do rebanho dessa região. Visto isso, o presente estudo objetivou a pesquisa de micoplasmas em caprinos, por meio da detecção molecular, na região sudoeste do Estado da Bahia, Brasil. Foram aplicados questionários em 12 propriedades e obtenção de amostras por *swab* da conjuntiva ocular, nasal e vaginal de 132 caprinos. As metodologias da PCR e qPCR foram aplicadas em *swabs* para a detecção dos *Mollicutes* de importância na caprinocultura. Foram realizadas análises estatísticas para a identificação de associações entre a presença dos *Mollicutes* e o manejo dos animais. Observou-se que 70% das propriedades são de criações para corte, 80% eram propriedades comerciais e 90% utilizavam o sistema intensivo de criação. Nas avaliações clínicas 22,7% (30/132), 13,6% (18/132) e 6,8% (9/132) dos animais respectivamente apresentavam linfonodos pré escapular, iguinal e submandibulares alterados. Mucosa genital e ocular hiperêmica foram observadas em 9,8% (13/132) dos animais. Identificou-se por PCR convencional, 67,4% (89/132), 20,8% (26/125) e 6,8% (9/132) das amostras nasais, genitais e oculares respectivamente, presença do DNA de microrganismos da classe *Mollicutes*. *M. agalactiae* foi detectado em 4,5% (6/132) das amostras nasais e *M. conjunctivae* em 1,5% (2/132) das amostras oculares. Não foi detectado DNA por PCR convencional *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, assim como por qPCR *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*. Constatou-se relação

positiva entre animais provenientes de sistema intensivo de criação e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras nasais (OR: 6,417; IC: 1,551 – 26,546). Relação positiva também foi observada entre animais oriundos de propriedades com exploração leiteira e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras oculares (OR: 6,441; IC: 1,235-33,581). Assim como entre animais provenientes de sistema extensivo de criação e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras genitais (OR: 3,900; IC: 1,028 – 14,796). Não foi observada associação estatisticamente significativa na correlação entre as variáveis de interesse e o resultado das PCR convencionais para *M. agalactiae* em amostras nasais e para *M. conjunctivae* em amostras oculares. Conclui-se que os micoplasmas estão presentes nas criações de caprinos da região sudoeste da Bahia. A identificação de *M. conjunctivae*, descrito uma única vez na literatura nacional, que apesar da baixa ocorrência possui caráter endêmico; reforçam ainda mais a necessidade de estudos mais enfatizados na identificação dos micoplasmas assim como a elaboração de um perfil sanitário desse tipo de criação na região nordeste do Brasil.

Palavras-chave: Micoplasmas. *Mycoplasma conjunctivae*. Epidemiologia. Caprinos.

ABSTRACT

CASTILHO JUNIOR, R. E. **Molecular detection of *Mollicutes* in goats from southwest of Bahia, Brazil: a cross sectional study.** [Detecção molecular de *Mollicutes* em caprinos do sudoeste da Bahia, Brasil: um estudo transversal.].82p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Brazil has about 8.6 million goats and more than 90% are located in the northeast region of the country. The goat breeding, due to its great adaptability to the different ecosystems, has social and economic importance in the region. In this context, the mycoplasmas that colonize the goats are inserted. Caprine mycoplasmosis is widely disseminated worldwide and has socioeconomic relevance in its creation. The low technification of the properties, failure to detect *Mollicutes* and the low scientific production demonstrate a worrying scenario regarding the sanity of the herd of this region. Considering this, the present study aimed at the research of mycoplasmas in goats, through molecular detection, in the southwest region of the State of Bahia, Brazil. Questionnaires were applied on 12 properties and swab samples were obtained from the ocular, nasal and vaginal conjunctiva of 132 goats. The PCR and qPCR methodologies were applied in the swabs for the detection of *Mollicutes* of importance in goat breeding. Statistical analyzes were performed to identify associations between the presence of *Mollicutes* and the management of the animals. It was observed that 70% of the properties are meat farms, 80% were commercial properties and 90% used the intensive breed system. In the clinical evaluations, 22.7% (30/132), 13.6% (18/132) and 6.8% (9/132) of the animals respectively presented pre-scapular, equine and altered submandibular lymph nodes. Genital and ocular hyperemic mucosa were observed in 9.8% (13/132) of the animals. From the analysed swabs, 67.4% (89/132), 20.8% (26/125) and 6.8% (9/132) of the nasal, genital and ocular samples respectively, were identified by PCR, positive for the presence of DNA from microorganisms of the *Mollicutes* class. *M. agalactiae* was detected in 4.5% (6/132) of the nasal samples and *M. conjunctivae* in 1.5% (2/132) of the ocular samples. No DNA was detected by conventional PCR of *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, as well as by qPCR of *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*. A positive correlation was observed between animals from intensive breeding system and conventional PCR positive for *Mollicutes*

class in nasal samples (OR: 6,417; CI: 1,551 - 26,546). Positive correlation was also observed between animals from dairy farms and conventional PCR positive for *Mollicutes* class in ocular samples (OR: 6,441; CI: 1,235-33,581). As well as between animals from the extensive breeding system and conventional *Mollicutes* positive PCR in genital samples (OR: 3,900; CI: 1,028 - 14,796). No statistically significant association was observed in the correlation between the variables of interest and the results of conventional PCR for *M. agalactiae* in nasal samples and for *M. conjunctivae* in ocular samples. It is concluded that mycoplasmas are present in goat breeding in the southwestern region of Bahia. The identification of *M. conjunctivae*, described only once in the national literature, which despite the low occurrence has an endemic character; reinforces the need for more focused studies in the identification of mycoplasmas as well as the elaboration of a health profile of this type of breeding in northeastern Brazil.

Keywords: Mycoplasmas. *Mycoplasma conjunctivae*. Epidemiology. Goats.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Colônias de *M. agalactiae* em meio SP4 visualizadas em lupa. A: Colônias típicas em forma de “ovo frito”. B: Formação de biofilme. C: Formação de manchas devido à reação de *M. agalactiae* e o soro equino no meio de cultura.....244
- Figura 2 - Cidades do Sudoeste da Bahia onde foram coletadas as amostras para presente estudo. Fonte: SEI – BA, 201537
- Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando primers GPO3 e MGSO para classe Mollicutes.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de amostras coletadas por Município do Sudoeste baiano – São Paulo - 2016.....	38
Tabela 2 - Frequência das variáveis nas propriedades de origem dos animais dos quais se coletou amostras analisadas.	47
Tabela 3 - Frequência das variáveis individuais dos animais dos quais se coletou amostras posteriormente analisadas.	48
Tabela 4 - Detecção de <i>Mollicutes</i> pela PCR convencional em materiais clínico obtidos de secreções nasais, genitais e oculares respectivamente – Bahia.	49
Tabela 5 - Percentagem e detecção de <i>M. agalactiae</i> , <i>M. conjunctivae</i> , <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> , <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> e <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i> pela PCR convencional em materiais clínico obtidos de secreções nasais, genitais. Bahia.....	50
Tabela 6 - Associação entre as variáveis de interesse e resultado da PCR convencional para detecção de micro-organismos da classe classe <i>Mollicutes</i> em amostras nasais – Bahia.	52
Tabela 7 - Associação entre as variáveis de interesse e resultados da PCR convencional para detecção de micro-organismos da classe <i>Mollicutes</i> em amostras oculares - Bahia.	53
Tabela 8 - Associação entre as variáveis de interesse e resultados da PCR convencional para detecção de micro-organismos classe <i>Mollicutes</i> em amostras genitais - Bahia.	54
Tabela 9 - Associação entre as variáveis de interesse e resultados da PCR convencional para <i>M. agalactiae</i> em amostras nasais - Bahia.....	56
Tabela 10 - Associação entre as variáveis de interesse e os resultados PCR convencional para <i>M. conjunctivae</i> em amostras oculares - Bahia. ..	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - <i>Primers</i> específicos para detecção de integrantes do Classe <i>Mollicutes</i> , sequências e tamanho do produto amplificado.....	41
Quadro 2 - <i>Primers</i> específicos para detecção das espécies alvo de micoplasmas, sequências e tamanho do produto amplificado.....	44
Quadro 3 - <i>Primers</i> específicos para detecção de <i>M. capricolum capripneumoniae</i> , sequências e tamanho do produto amplificado.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	199
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 OS MICOPLASMAS	21
2.2 <i>Mycoplasma agalactiae</i>	233
2.3 <i>Mycoplasma conjunctivae</i>	299
2.4 <i>Cluster Mycoides</i>	31
3. OBJETIVOS.....	356
3.1 OBJETIVO GERAL.....	366
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	366
4. MATERIAIS E MÉTODOS	377
4.1 SELEÇÃO DAS PROPRIEDADES RURAIS.....	377
4.2 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E EXAMES CLÍNICOS.....	388
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS.....	388
4.4 APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIOS EPIDEMIOLÓGICOS	399
4.5 CULTIVO DOS CONTROLES	399
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA DOS MICOPLASMAS.....	40
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	41
4.7.1 PCR CONVENCIONAL GENÉRICA (Detecção de <i>Mycoplasma spp.</i>)	41
4.7.2 PCR's CONVENCIONAIS ESPÉCIE-ESPECÍFICAS.....	422
4.7.3 qPCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA	444
4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	455
5. RESULTADOS.....	466
6. DISCUSSÃO	588
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	644
REFERÊNCIAS.....	666
ANEXOS	80

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística o Brasil, possuía em 2012 um rebanho caprino de aproximadamente 8,6 milhões de animais. A região Nordeste representa mais de 90% desse total, principalmente os estados da Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará, que juntos correspondem a mais de 75% do rebanho nacional (IBGE, 2012). O Brasil encontra-se no 31º lugar no ranking mundial de exportações de carne de caprinos e ovinos (APEDA, 2014).

Dados como estes apontam a caprinocultura com uma atividade de extrema importância cultural, social e econômica, principalmente na região Nordeste do Brasil, onde tem desempenhado papel crucial em seu desenvolvimento (COSTA et al., 2008). A produção de leite e carne possuem alto valor nutricional e sua pele de excelente qualidade, assim, devido à adaptabilidade dos animais aos diferentes ecossistemas, representam importante alternativa de trabalho e renda (FILGUEIRA et al., 2009).

As micoplasmoses em caprinos são amplamente disseminadas pelo mundo (ADEHAN et al., 2006) e representam um grande problema socioeconômico, principalmente em regiões que dependem desses animais como fonte renda (RAZIN, 2002). Devido à cultura dos criadores nordestinos na participação em feiras e exposições, a troca de animais reprodutores entre os produtores menores e a rápida disseminação desses micro-organismos (BANDEIRA et al., 2008), associada à falha na detecção, proporciona a expressiva propagação das micoplasmoses por todo rebanho caprino nordestino (CÂMARA, SILVA e GUERRA, 2015).

O manejo inadequado é um dos fatores que mais contribuem para a diminuição da produtividade e ocorrência de altas taxas de mortalidade verificadas nos rebanhos da região nordeste do Brasil (COSTA et al., 2008; FILGUEIRA et al.,

2009). Observa-se também uma discordância nos limites indicativos da presença da infecção, o que sugere um vasto campo de pesquisa com o objetivo de determinar os reais limites de detecção (Peixoto, Mota e Da Costa, 2010).

Embora tenha sido conduzido na região sudoeste do Estado de São Paulo, um estudo realizado por Cardoso *et al.* (2008), identificou-se razoáveis prevalências de micro-organismos causadores de zoonoses e elevados índices de verminoses no rebanho caprino e ovino causando expressivas perdas econômicas. Estes dados demonstram a necessidade na tecnificação da produção, além de estabelecer protocolos de identificação e controle de sanidade para o rebanho caprino brasileiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OS MICOPLASMAS

O termo micoplasmas, informalmente, é empregado na designação dos micro-organismos do Filo *Tenericutes*, da Classe *Mollicutes*, composta por quatro ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeapasmatales* e *Anaeroplasmatales*), sete famílias (*Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeapasmataceae*, *Anaeroplasmataceae*, *Incetae* sedis da ordem *Mycoplasmatales* e *Incetae* sedis da ordem *Acholeapasmatales*) e 11 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeaplasma*, *Candidatus Phytoplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*) (BERGEY'S Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2015).

Esses micro-organismos são capazes de colonizar humanos, animais (mamíferos, répteis, aves, peixes), insetos e plantas (RAZIN & HAYFLICK, 2010). Entre as diferentes espécies de *Mollicutes* que acometem animais, apenas uma pequena parcela, principalmente do gênero *Mycoplasma*, são patogênicos (RAZIN, 2002). São considerados os menores e mais simples micro-organismos auto-replicantes de formato predominantemente esférico com diâmetro entre 0,3 e 0,8µm e por esse motivo, foram considerados vírus inicialmente pela filtrabilidade em filtros de poros que usualmente retém bactérias. Atualmente são definidos como um grupo de bactérias filogeneticamente relacionados à Gram positivas com perda da parede celular por evolução degenerativa (RAZIN & HAYFLICK, 2010).

A ausência de parede celular confere aos micoplasmas características como a sensibilidade à choque osmótico e a ação de detergentes, resistência à penicilina e à outros antibiótico β -lactâmicos e a formação de colônias em forma de “ovo-frito” (RAZIN & HAYFLICK, 2010). Os micoplasmas têm genoma reduzido, possuem entre 0,58 – 1,35 Mb e por esse motivo apresentam reduzida capacidade de codificação, além de limitadas vias metabólicas e capacidade de biossíntese, necessitando de íntima relação com célula hospedeira para nutrição e crescimento (ROTTEM, 2003; SIRAND-PUGNET, et al.,2007).

Majoritariamente, os micoplasmas vivem de forma comensal com seus hospedeiros, causando na maioria das vezes infecções crônicas e não agudas (RAZIN & HAYFLICK, 2010). A patogenicidade dos micoplasmas ainda não é conhecida por completo em todas as espécies. Até o momento foram descritos: mecanismos de competição por nutrientes, formação de biofilme, eliminação de metabólitos durante a produção de ATP através da fermentação de glicose ou hidrólise de arginina dependendo da espécie, variação da cito-aderência, antígenos de superfície com capacidade de variação antigênica e invasão celular (YOGEV et al. 2002; ROTTEM, 2003; MCAULIFE et al. 2006; RAZIN & HAYFLICK, 2010,HEGDGE, 2014).

As espécies de micoplasmas com maior relevância para a produção de pequenos ruminantes são: *Mycoplasma agalactiae*, *M. conjunctivae*, *M. mycoides* subespécie *capri* (Mmc), *M. capricolum* subespécie *capricolum* (Mcc), *M. capricolum* subespécie *capripneumoniae* (Mccp) (RAZIN, 2002) e mais raramente *M. putrefaciens* (GIL, 2003). Possuem características genéticas e fenotípicas extremamente semelhantes, dificultando sua classificação taxonômica e diagnóstico laboratorial quando não se dispõe de técnicas moleculares (OIE, 2008).

Os micoplasmas podem ser responsáveis por afecções em sistema respiratório (pleuropneumonia e pneumonia), mastite, artrite e poliartrite, doenças genitais e lesões oculares (conjuntivite e cerato-conjuntivite) (NICHOLAS, 2002; GREGORY et al., 2003; ADEHAN et al., 2006; RAZIN & HAYFLICK, 2010). As enfermidades relacionadas aos micoplasmas de maior relevância em caprinos são a Agalaxia Contagiosa (AC) Caprina causada principalmente por *M. agalactiae* e a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) associada a *M. capricolum* subespécie *capripneumoniae*. Essas doenças são de notificação obrigatória à Organização Internacional de Epizootias (OIE) devido a seu impacto econômico (OIE, 2008; 2014).

2.2 *Mycoplasma agalactiae*

M. agalactiae é uma bactéria polimórfica, imóvel, de tamanho entre 124 e 250nm e desenvolvem colônias em formato de “ovo-frito” (BERGEY’S, 2010). Com genoma reduzido (aproximadamente 0.88 Mb), tem como característica a produção de biofilme composto de colesterol e fosfolipídeos, com em média 1 a 2 mm de diâmetro e apresentação de pontos escuros de ácidos graxos ao redor das colônias, num efeito conhecido como “filmes e manchas” (McAULIFE et al., 2006; SIRAND-PUGNET et al. 2007) (Figura 1). Cresce em meio SP 4 ou Hayflick suplementado com glicose à 37°C. Como características metabólicas não fermentam glicose e não hidrolisam arginina, sendo capazes de metabolizar ácidos orgânicos como lactato e piruvato (KHAN, et al. 2004; BERGEY’S, 2010; RAZIN, 2010; KUMAR et al. 2013).

Figura 1: Colônias de *M. agalactiae* em meio SP4 visualizadas em lupa. A: Colônias típicas em forma de “ovo frito”. B: Formação de biofilme. C: Formação de manchas devido à reação de *M. agalactiae* e o soro equino no meio de cultura.

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E.

Como elementos de patogenicidade apresentam invasão celular *in vitro* e *in vivo* em ovelhas experimentalmente infectadas (HEGDE et al., 2014). Possuem alto potencial antigênico por variação antigênica nas proteínas de membrana e transposição da barreira epitelial aumentando a possibilidade de infecção sistêmica e explicando o caráter crônico de sua infecção devido à evasão do sistema imune do hospedeiro com disseminação para diversos órgãos (SIRAND-PUGNET et al. 2007; HEGDE et al., 2014; 2015).

M. agalactiae é o principal agente etiológico da Agalaxia Contagiosa (AC). Entretanto, outras espécies como *M. mycoides capri*, *M. capricolum capricolum* e *M. putrefaciens* também podem causar manifestações clínicas semelhantes em caprinos. É uma enfermidade que pode apresentar caráter agudo, sub-agudo ou

crônico, sendo caracterizada pelo envolvimento clássico da tríade de glândulas mamárias, articulações e sistema ocular. Em casos mais avançados pode acometer o trato respiratório. Prostração, mastite, ceratoconjuntivite, artrite/poliartrite, agalaxia, laminite, emaciação, hipertermia e anorexia são sinais clínicos frequentemente observados nessa enfermidade, podendo ocorrer morte dos animais infectados (CONTRERAS, 2003; AZEVEDO, 2005; AZEVEDO et al. 2006; CORRALES, 2007; OIE, 2014; KUMAR et al. 2014; SANTOS et al. 2015).

A AC é uma enfermidade de alto impacto econômico, seja pela morte dos animais, drástica queda na produção de leite, a extrema dificuldade na eliminação da doença. (CONTRERAS, 2003; AZEVEDO, 2005; AZEVEDO et al. 2006; CORRALES, 2007). Por esse motivo se faz necessário o aumento no uso de antibióticos que são eliminados no leite por período prolongado impossibilitando sua comercialização (CORRALES, 2007). Quando comparado com outros patógenos intramamários, os micoplasmas apresentam elevada prevalência (CONTRERAS, 2003).

Além de promoverem as manifestações clínicas clássicas descritas para AC, *M. agalactiae* juntamente com *M. mycoides* subsp. *capri*, possuem a capacidade de acometer o sistema reprodutivo. Podem ser eliminados pelo sêmen de machos naturalmente infectados (DE LA FE et al. 2009; GÓMEZ-MARTÍN et al. 2012; PRATS-VAN DER HAM et al. 2016), além de manterem-se viáveis no sêmen fresco e diluído em condições considerada infectante para ambas espécies (GÓMEZ-MARTÍN, A. et al. 2015; DE LA FE et al. 2015).

Em estudos recentes, comprovou-se que sua presença no sêmen possivelmente desencadeie efeitos deletérios ao trato reprodutivo de caprinos e ovinos (GÓMEZ-MARTÍN et al. 2013). Além disso, devido à capacidade de

sobreviverem no trato reprodutivo acredita-se na possibilidade de transmissão venérea desses micro-organismos, embora ainda não tenha sido provada até o momento (GÓMEZ-MARTÍN et al. 2015). A via de infecção usual de *M. agalactiae* é o contato direto com secreções infectadas como: as oculares, nasais, genitais, leite e urina (AZEVEDO et al. 2006, KUMAR et al., 2013). Atualmente foi descrito o potencial de infecção congênita e por ingestão do leite colostro, resultando em filhotes com poliartrite e demais manifestações clínicas clássicas de AC (FILIOUSSIS et al. 2011; SILVA et al. 2014).

No Brasil a primeira descrição de sinais clínicos semelhantes a AC foi registrado em São Paulo, em 1942, sem confirmação de espécie por Penha e D'apice. Passados 60 anos, *M. agalactiae* foi isolado e identificado como agente responsável por surto de AC em caprinos leiteiros no estado da Paraíba (NASCIMENTO et al., 2002) e 4 anos mais tarde o micro-organismo também foi identificado nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte (AZEVEDO et al., 2006). Sete surtos de AC foram descritos em pequenos ruminantes na região nordeste, nos estados de Pernambuco, Paraíba, e Rio Grande do Norte, com animais apresentando quadros clínicos de mastite associados à agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite (AZEVEDO, 2005).

Bandeira et al. (2008) detectaram a presença de *M. agalactiae* em 7,5% dos animais e em 20% das propriedades estudadas, do estado da Paraíba. Os pesquisadores reforçam a necessidade da inclusão desse patógeno nos estudos sobre mastite e artrite no rebanho de caprinos. Sugeriram também que sua rápida disseminação pode ser causada pelo intenso mercado e trânsito de animais entre os criadores de três estados, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

Adicionalmente, verificou-se a relação do histórico de participações em feiras e a ocorrência exposições e surtos de micoplasmoses nesses estados.

Mais recentemente foi descrito soro prevalência superior a 56% (307/544) para *M. agalactiae* em caprinos no estado da Paraíba. Alcantara et al. (2010), estudaram caprinos em 20 propriedades da Paraíba, onde 65% delas (13) apresentaram animais com sinais clínicos de agalaxia contagiosa. Além disso, 49 animais soropositivos desenvolveram manifestações clínicas. A mastite foi a mais comum (77,5%), seguido de artrite (12,24%). Não foi identificado diferença estatística entre sexo e idade.

Em estudo conduzido em Sergipe por Santos et al. 2015, 10,3% (20/194) dos caprinos apresentaram anticorpos contra- *M. agalactiae*, em propriedades que relataram adquirir animais de outras regiões para reposição do rebanho e/ou participação de feiras e torneios leiteiros em diferentes municípios. Estes dados corroboram com Bandeira et al., (2008) e Câmara, Silva e Guerra (2015) que sugerem que o trânsito animal aliado a falhas na detecção de micoplasmas são fatores de risco na disseminação dessas bactérias.

M. agalactiae é um micro-organismo de disseminação mundial, ocorrendo principalmente nos países mediterrâneos e do sudoeste asiático. Contudo sua presença é descrita ao redor do mundo, em países como: Grécia (FILIOUSSIS et al. 2011), Espanha (ARIZA-MIGUEL et al., 2012), França (TARDY et al. 2012), Itália, Mongólia, Irã (LORIA & NICHOLAS, 2013), Jordânia , Iraque (AL- MOMANI et al., 2008), Brasil (AZEVEDO et al., 2006; ALCÂNTARA et al., 2010; Santos et al. 2015), Estados Unidos, Austrália, Rússia (OIE, 2014) e Índia (KUMAR et al., 2013). Na Espanha, Ariza-Miguel et al., (2012) constataram que, dos 922 rebanhos testados, 36,8% (339) foram positivos para *M. agalactiae* utilizando qPCR e 9,2% (85/922)

positivos por identificação microbiológica (ARIZA-MIGUEL et al. 2012). No mesmo país, Prats-Van Der Ham et al. (2016) identificaram a presença de *M. agalactiae* em 26,5% dos caprinos assintomáticos que tiveram seu ejaculado testado. No Irã, Kherzi et al. (2014), entre os 189 pequenos ruminantes com manifestações clínicas de AC estudados, identificou-se, por PCR convencional, 76,2% de animais positivos para *Mycoplasma* spp. Entre as amostras positivas, 16% permitiram o isolamento de *M. agalactiae*, do swab ocular, leite e fluído sinovial.

O diagnóstico de *M. agalactiae* pode ser realizado por meio de isolamento e identificação em meio líquido e sólido, (AMORES et al. 2010; GÓMEZ-MARTÍN et al, 2012; OIE, 2014), testes bioquímicos, sorológicos como o ELISA (CAMPOS et al. 2009), além de técnicas moleculares como PCR convencional (CHAVEZ-GONZÁLES; ROS-BASCUÑANA et al. 1995 AMORES et al. 2010); e qPCR (FITZMAURICE, 2008; BECKER et al., 2012). O controle desse patógeno é comumente realizado por meio de terapia antimicrobiana, exceto β -lactâmicos, sendo utilizados principalmente macrolídeos, fluorquinolonas e tetraciclina (PATERNA et al. 2014).

A vacinação pode ser considerada como técnica de prevenção, principalmente a atenuada. Entretanto, não apresentam grande eficácia, mas que quando aplicadas em animais lactantes reduzem a produção leiteira ao mesmo tempo em que controlam e minimiza as lesões oculares e articulares. Porém os animais permanecem eliminando a bactéria através do leite e por essa razão esse tipo de vacina é proibida em diversos países (MADANAT et al., 2001; OIE, 2014). No Brasil ainda não existe vacina comercial contra *M. agalactiae* (CAMPOS et al., 2013).

2.3 *Mycoplasma conjunctivae*

M. conjunctivae tem formato cocóide e é imóvel. Suas colônias em meio sólido (SP4 e Hayflick suplementados com glicose à 37°C) apresentam centro elevado de coloração entre verde e marrom (BERGEY'S, 2010). Com genoma reduzido de 0,85 Mb (CALDERON-COPETE et al., 2009) e predileção por mucosas, tem patogenicidade ligada principalmente a liberação de metabólitos tóxicos e competição por nutrientes com as células do hospedeiro. Usualmente causam infecções crônicas (SIRAND-PUGNET et al., 2007)

M. conjunctivae é considerado o principal agente etiológico da Ceratoconjuntivite Infecciosa em Caprinos (CIC) (GIACOMETTI et al., 1998; 2002; HOSIE, 2007; CALDERON-COPETE et al., 2009; MARCO et al., 2009). As manifestações clínicas dessa enfermidade são caracterizadas por infecção de conjuntiva com secreção purulenta e alterações na córnea com edema, neovascularização, ceratite, conjuntivite e blefaroespasmos. Nos estados mais avançados observa-se opacidade, ulcerações e até perfuração de córnea levando à cegueira (MAYER et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2004; MAVROT et al., 2012).

Um mesmo animal pode apresentar-se infectado por dois tipos cepas de *M. conjunctivae* (uma em cada olho, por exemplo) como constatado por Belloy et al. (2003). As taxas de morbidade e mortalidade atingem até 30% (GIACOMETTI et al., 2002). Sabe-se que os animais podem ser positivos para o micro-organismo e não desenvolverem manifestações clínicas que, por sua vez, são influenciadas por fatores ambientais, fatores individuais, concentração e estirpe de *M. conjunctivae*. Sugere-se também que outros agentes infecciosos possam estar envolvidos no agravamento dos quadros (MAVROT et al., 2012; FERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2013).

A transmissão ocorre principalmente pelo contato direto da secreção ocular, vento, ou ainda, por moscas que servem como vetores da bactéria (DEGIORGIS et al. 1999; GIACOMETTI et al. 2002). O diagnóstico de *M. conjunctivae* ocorre pela cultura e identificação em meio líquido e sólido, testes bioquímicos e sorológicos (JANOVSKY, 2001; BELLOY et al. 2001), assim como por biologia molecular, PCR convencional e qPCR (GIACOMETTI et al. 1999; VILEI et al., 2007). Como forma de tratamento comumente se utiliza a antibioticoterapia com tetraciclina (BERGEY'S, 2010).

O primeiro relato de CIC por *M. conjunctivae* no Brasil foi descrito por Gregory et al. (2003). Até então, a ceratoconjuntivite contagiosa caprina era associada a quadros multissistêmicos causados por infecção de *M. mycoides* subsp. *capri* como descrito por Nascimento et al. (1986) em surtos nos estados de Rio de Janeiro e Minas Gerais. No estudo de Gregory et al. (2003), três caprinos, provenientes da cidade de São Bernardo do Campo, apresentavam edema de córnea, hiperemia de conjuntiva ocular, blefaroespasmos e secreção ocular sero-mucosas. Através de amostras de secreção ocular foi identificada a presença de *M. conjunctivae* por isolamento e provas bioquímicas. No ano seguinte Almeida Neto et al., (2004), descreve, também pela primeira vez no Brasil, a presença de *M. conjunctivae* em ovinos com ceratoconjuntivite infecciosa e assintomáticos. A detecção foi feita por PCR e constatou que: 15% (9/60) dos animais sadios e de 62,5% (5/8) dos animais com sinais clínicos graves foram positivos para presença de *M. conjunctivae*. Até o presente momento, ao nosso conhecimento, não foi relatada mais nenhuma notificação da presença de *M. conjunctivae* em caprinos no Brasil.

M. conjunctivae já foi descrito em alguns países do mundo como Suíça (JANOVSKY et al., 2001; MAVROT et al., 2012), Croácia (NAGLIĆ et al., 2000),

Paquistão (SHAHZAD et al., 2013), Espanha (FERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2013) e Holanda (TER LAAK, SCHREUDER E SMITH-BUYS, 1988), onde os surtos de CIC costumam ser observados nos períodos de verão e outono, demonstrando relação com a época em que a atividade das moscas é maior (JANOVSKY et al., 2001; GIACOMETTI et al. 2002).

Na Suíça a prevalência de *M. conjunctivae* é de aproximadamente 53% na população de caprinos adultos (JANOVSKY et al., 2001), e 12,2% e 22,2% em duas espécies de caprinos selvagens assintomáticos, variando com relação a ano, região e espécie de origem das amostras (MAVROT et al., 2012). No Paquistão, o micro-organismo foi encontrado em 59% dos ovinos testados utilizando amostras de muco ocular (SHAHZAD et al., 2013). Na região norte da Espanha 25,7% dos rebanhos selvagens de caprino e ovino (FERNÁNDEZ-AGUILAR et al., 2013) foram positivos. Nos Pirineus espanhóis, identificou-se a presença de *M. conjunctivae* em 88,5% dos animais com sinais clínicos de CIC (ARNAL et al., 2013).

A população doméstica de caprinos, diferente do que se imaginava, não se apresenta como fator relevante na epidemiologia do *M. conjunctivae*, enquanto no caso de ovinos, animais domésticos tem importante papel na manutenção da prevalência do micro-organismo no ambiente como demonstrado por Fernández-Aguilar et al. (2013).

2.4 Cluster Mycoides

Os integrantes do *cluster* Mycoides destacam-se como importantes micro-organismos causadores de infecção em ruminantes. É constituído por *M. leachii*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC (Small Colony), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp), *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc) e *M. capricolum* subsp.

capricolum (Mcc), onde os três últimos são aqueles que representam maior importância na caprinocultura (TARDY et al., 2009; MANSO-SILVAN et al., 2009; BERGEY'S, 2010).

Atualmente a designação *Mycoplasma* subsp. *mycoides capri* (Mmc) refere-se tanto aos organismos da subespécie *mycoides capri* (Mmc) como aos da subespécie *mycoides mycoides* Large Colony (MmmLC) (MANSO-SILVAN et al., 2009; SHAHRAM et al., 2010). Todos estão listados no Código de Saúde Animal Terrestre da Organização Internacional de Epizootias (OIE). São muito semelhantes filogenética, bioquímica e sorologicamente causando dificuldades em sua identificação (MANSO-SILVAN et al. 2007; BERGEY'S, 2010; OIE, 2014).

Mcc e Mccp são cocobacilares e Mmc pleomórfico com capacidade de formar longos filamentos. São todos imóveis, apresentam colônias em formato clássico de “ovo frito”, crescem em meio SP4 e Hayflick suplementados com glicose a 37°C (BERGEY'S, 2010). Mcc e Mmc apresentam formação de biofilme, porém de maneira mais discreta quando comparado com *M. agalactiae* e *M. bovis*, espécies apresentam essa característica bem definida (McAULIFE, 2006).

Devido a grande proximidade filogenética, reações cruzadas entre Mcc, Mccp e *M. leachii*, ou ainda entre Mmc e *M. mycoides mycoides* (MANSO-SILVAN et al. 2007) podem ser observadas. Dessa forma, a identificação do agente se torna fundamentalmente baseada em testes sorológicos e moleculares amplamente descritos e testados (BASCUNANA et al., 1994; BASHIRUDDIN et al., 1994; HOTZEL et al. 1996; MONNERAT et al. 1999a; WOUBIT et al. , 2004; LORENZON et al., 2008; MAIGRE et al. 2008).

Podem ser encontrados, no caso de Mcc e Mmc, principalmente, em líquido sinovial, conjuntiva ocular, canal auricular, tetos e leite, enquanto Mccp é isolado em

trato respiratório inferior, linfonodos, líquido pleural e mediastino (BERGEY'S, 2010; OIE, 2014). Esses micro-organismos possuem baixa porcentagem de GC e genoma de 1,01 Mb para Mcc, 1,02 Mb para Mccp e 1,03 Mb para Mmc (CHU et al. 2011; GLASS et al. 2013; SCHIECK et al. 2016). Tem sua patogenicidade pouco compreendida, porém aceita-se a teoria de serem incapazes de induzir resposta imune celular T CD4, o que explica a incapacidade de estimularem resposta imune de longa duração por vacinação (COMSTOCK e KASPER, 2006; SCHIECK et al. 2016). No caso de Mccp foram descritos genes que relacionam sua virulência com a síntese de cápsula e a produção de H₂O₂ e hemolisinas (CHU et al. 2011).

Quanto às medidas terapêuticas aplicáveis recomenda-se para Mcc a utilização de macrolídeos e tetraciclinas, em casos agudos o tratamento consegue eliminar o agente, fato que não ocorre nos casos crônicos, sendo a melhor forma de controle o tratamento imediato e melhorias sanitárias. Nos casos de infecção por Mmc pode-se utilizar as tetraciclinas, porém seu controle em rebanho é complicado uma vez que pode permanecer no conduto auditivo sem causar sinais clínicos nem soro conversão (BERGEY'S, 2010).

Já para os casos de Mccp apesar da sensibilidade a tilosina e tetraciclina, a antibioticoterapia deve ser substituída pelo abate do rebanho infectado pelo caráter endêmico do agente (THIAUCOURT et al., 1996; BERGEY'S, 2010; OIE, 2014). A produção de vacinas para esses agentes é de grande interesse para a comunidade científica, sendo descritas vacinas experimentais de Mmc inativado apresentando eficácia em desafios subsequentes (DE LA FE et al., 2007a). Da mesma forma são desenvolvidos testes com vacinas vivas e inativadas para controle de Mccp, porém, nesse caso, em sua maioria não tem obtido o sucesso necessário para um programa eficaz de prevenção (BROWNING et al., 2005).

M. capricolum subsp. *capripneumoniae* é o principal agente etiológico da Pleuropneumonia contagiosa caprina (PPCC), que é uma enfermidade usualmente fatal que afeta preferencialmente caprinos domésticos, de transmissão por contato direto e aerossóis. As taxas de morbidade e mortalidade observadas são de até 90% e 60% respectivamente, gerando grandes perdas econômicas principalmente nos continentes Africano e Asiático (NICHOLAS, 2002; NICHOLAS e CHURCHWARD, 2012; WANG et al. 2014). Em sua forma clássica a PPCC é caracterizada por pleuropneumonia unilateral sero-fibrinosa com adesões, pleurite e edema intersticial intralobular do pulmão. *M. m. capri* pode causar sinais clínicos semelhantes com pleuropneumonia com espessamento dos septos interlobulares comumente referido de maneira errônea como PPCC (THIAUCOURT e BÖLSKE, 1996; NICHOLAS, 2002; AWAN et al., 2010; BERGEY'S, 2010; NICHOLAS e CHURCHWARD, 2012; YU et al., 2013).

Apesar de nunca ter sido relatada no continente americano (NICHOLAS et al., 2008), a PPCC é uma enfermidade de ampla disseminação mundial, tendo sido descrita pela primeira vez em 1873 na Argélia e introduzida à África do Sul em 1881 por um carregamento de caprinos Angorá vindos da Turquia (HUTCHEON, 1881). Passados quase cem anos, no Quênia, pela primeira vez Mccp foi isolado e descrito como responsável por causar PPCC (MACMARTIN et al. 1980). Tendo sido relatado à partir de então na Etiópia, Níger, Omã, Sudão, Tanzânia, Tunísia, Turquia, Uganda, Emirados Árabes Unidos, Grécia (OIE, 2014) e mais recentemente no Paquistão (AWAN et al., 2009),Tajiquistão (AMIRBEKOV et al, 2010) e China (CHU et al., 2011).

M. mycoides subsp. *capri* e *M. capricolum* subsp. *capricolum*, podem ser agentes etiológicos da agalaxia contagiosa causando sinais clínicos de mastite,

poliartrite e conjuntivite, assim como desenvolvimento de sinais de pneumonia, peritonite e septicemia em caprinos (EGWU et al., 1996; DE LA FE et al. 2007b; CORRALES et al. 2007; NICHOLAS et al. 2008). Ambos apresentam transmissão relacionada ao contato direto com animais infectados ou fômites, no caso de Mmc, pode ainda ocorrer a transmissão por carrapatos de orelha (*Psoroptes cuniculi*), que fazem o papel de vetores (BERGEY'S, 2010). Recentemente, foi descrita pela primeira vez na literatura, uma infecção por Mcc como responsável pelo desenvolvimento de septicemia em humano devido provavelmente a ingestão de produtos de origem caprina em uma viagem à Cabo Verde (HELLER et al. 2015).

Atualmente a designação *Mycoplasma* subsp. *mycoides capri* (Mmc) refere-se tanto aos organismos da subespécie *mycoides capri* (Mmc) como da subespécie *mycoides mycoides* Large Colony (MmmLC) (MANSO-SILVA et al. , 2009; SHAHRAM et al., 2010). No Brasil teve seu isolamento em caprinos descrito pela primeira e única vez a mais de 30 anos por Nascimento et al. (1986). Possui distribuição mundial, tendo sido isolado na Espanha (DE LA FE et al. 2007b; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2012), Jordão (AL-MOMANI et al. 2006), México (HERNANDEZ et al. 2006), Paquistão (AWAN et al. 2009), França (CHAZEL et al. 2010), Índia (KUMAR et al. 2013), Irã (POURBAKHSH et al., 2015), África e Ásia (NICHOLAS e CHURCHWARD, 2012). Com destaque para os relatos onde são descritos como principais agentes de casos de agalaxia contagiosa (DE LA FE et al. 2007a; CHAZEL et al., 2010). No caso de Mmc, destacam-se os relatos de sua presença identificada no ejaculado de animais de centrais de reprodução com ampla distribuição geográfica do sêmen e por consequência do microrganismo (AMORES et al. 2010; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2012,2015).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de micoplasmas em caprinos, por meio de ensaios moleculares, na região sudoeste do Estado da Bahia, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar por reação em cadeia de polimerase convencional (PCR) e real time (qPCR), a presença de bactérias da classe *Mollicutes*, *M. agalactiae*, *M. conjunctivae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* em amostras nasais, genitais e de conjuntiva ocular de caprinos de propriedades localizadas na região do sudoeste do Estado da Bahia.
- Identificar associação entre os resultados das PCR's e qPCR com as variáveis individuais e de manejo sanitário e zootécnico aplicadas nas propriedades participantes.

4.2 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E EXAMES CLÍNICOS

Os animais foram selecionados independente da apresentação de manifestações clínicas. Nas criações de subsistência, todos os animais foram avaliados sempre que possível. Os exames clínicos seguiram uma sequência de avaliações e anotações em fichas semiológicas (Anexo A) (DELLA LIBERA, AZEDO e BLAGITZ, 2007).

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram realizadas coletas de amostras de *swab* nasal, genital e das conjuntivas oculares provenientes de animais das propriedades rurais selecionadas (Tabela 1). Os *swabs* foram obtidos por fricção nas mucosas de cada um dos 132 animais analisados, totalizando 396 amostras coletadas (132 de cada mucosa analisada) e armazenados em 4 mL de meio de transporte SP 4 e mantidos em refrigeração á 4°C por até 24 horas e congelados á -20°C para posterior análise.

Tabela 1: Distribuição de amostras coletadas por Município do Sudoeste baiano – São Paulo – 2016

Municípios	Número de Propriedades N (%)	Número de animais N (%)
Vitória da Conquista	5 (41,7)	47 (35,6)
Anagé	4 (33,4)	44 (33,4)
Brumado	1 (8,3)	19 (14,4)
Itapetinga	1 (8,3)	13 (9,8)
Bom Jesus da Serra	1 (8,3)	9 (6,8)
Total	12 (100,0)	132 (100,0)

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E.; ALMEIDA, C. S. D. (2016)

4.4 APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foram aplicados questionários fechados de variáveis qualitativas acerca das condições zootécnicas e higiênico-sanitárias das criações encontradas em todas as propriedades visitadas (WORTHEM et al., 2004). Sobre as condições zootécnicas das criações os questionários abordaram: o tipo de exploração (corte, leite), o tipo de criação (confinado ou extensivo), finalidade da exploração (comercial ou subsistência), o tipo de ordenha (manual ou mecânica), realização de segregação por faixa etária, o uso de técnica de inseminação artificial concomitante ou não, a monta natural, casos de abortamentos, de secreção nasal. Sobre as condições higiênico-sanitárias, a utilização de desinfetante na limpeza do ambiente de ordenha, a higiene do teto na pré-ordenha e pós-ordenha, o uso de luvas na ordenha manual (Anexo B).

Foi aplicado outro questionário individual referente aos parâmetros vitais (frequência cardíaca, respiratória e temperatura), avaliação de linfonodos, inspeção simples de conjuntivas ocular e genital, além de articulações, auscultação pulmonar e a avaliação das glândulas mamárias foi efetuada por inspeção direta e indireta através de CMT (*Califórnia Mastitis Test*) e Tamis (Anexo A) (DELLA LIBERA, AZEDO e BLAGITZ, 2007). Todas as variáveis foram divididas de forma dicotômica para facilitar a tabulação e análise dos dados.

4.5 CULTIVO DOS CONTROLES POSITIVOS

O cultivo dos micoplasmas de referência para controle positivo foram realizadas no laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB

II), sob orientação do Prof. Dr. Jorge Timenetsky. A cultura foi obtida em caldo e Agar SP4 incubadas por 7 dias a 37°C. O crescimento foi caracterizado pela alcalinização do caldo e produção de colônias em forma de “ovo frito” (RAZIN & HAYFLICK, 2010).

M. agalactiae (RJ), *M. conjunctivae* (2002) e *M. capricolum* subsp. *capricolum* (1972) pertenciam ao laboratório de Micoplasmas do ICB/USP sob responsabilidade do Prof. Dr. Jorge Timenetsky. *M. mycoides* subsp. *capri* foi cedido pelo Prof. Dr. Caio Cordova da Universidade Regional de Blumenau/ SC. Enquanto no caso de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* amostras de DNA foram cedidas pelos Dr. Frey e Dr. Falquet da Université de Fribourg (FR) e Dr. Thiaccourt e Dr^a. Manso-Silvan do CIRAD-INRA (FR).

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA DOS MICOPLASMAS

As culturas dos micoplasmas em caldo foram submetidas à extração de DNA pelo método de sílica (BOOM et al. 1990). A 500 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4; EDTA 0,5M, pH 7,0; isotiocianato de guanidina 4 mM) e 40 µL de suspensão de sílica foram adicionados a 700 µL da amostra. A suspensão foi homogeneizada e mantida em repouso por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 20.000 x g por 4 minutos, removendo-se o sobrenadante. O sedimento foi homogeneizado com 500 µL de tampão de lavagem (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,4; isotiocianato de guanidina 4 mM) por 30 segundos e centrifugado a 20.000 x g por 4 minutos (sendo esta etapa repetida duas vezes). O sobrenadante foi removido e o sedimento homogeneizado com 500 µL de etanol 70% gelado e centrifugado a 20.000 x g por 4 minutos. O sedimento foi novamente homogeneizado com 500 µL

de acetona gelada e centrifugado a 20.000 x g por 4 minutos. O sobrenadante foi removido e após total desidratação do sedimento adicionou-se 120 µL de água Milli-Q e homogeneizado. A solução foi incubada por 10 minutos a 56 °C e centrifugada a 20.000 x g por 10 minutos. Por fim o sobrenadante foi recolhido (80 µL) e armazenado a -20 °C até a realização da PCR.

Para a extração de DNA dos controles positivos empregou-se o protocolo do *kit* Invitrogen Purelink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), baseado na utilização de coluna de sílica, de acordo com o descrito pelo fabricante.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

4.7.1 PCR CONVENCIONAL GENÉRICA (Detecção de *Mycoplasma spp.*)

As amostras foram submetidas a detecção de micro-organismos pertencentes à classe *Mollicutes* por PCR utilizando *primers* complementares à sequência de oligonucleotídeos de gene 16S RNA ribossômico dos gêneros pertencentes à Classe *Mollicutes*, descrito por Van Kuppeveld *et al.* (1992), de modo a utiliza-lo como método de triagem.

Quadro 1: *Primers* específicos para detecção de integrantes do Classe *Mollicutes*, sequências e tamanho do produto amplificado.

Espécie	<i>Primers</i>	Sequências	Produto	Referência
Classe <i>Mollicutes</i>	GPO3	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	270pb	Kuppeveld et al. 1992.
	MGSO	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'		

Para o volume final de reação de 25 µL, utilizou-se: 2,5 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 1,0 µL MgCl₂ (50 mM); 4 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 0,4 µL de cada *primer* (50 pmol), 1,0 U Taq DNA Polimerase (Invitrogen™) e 1 µL de DNA extraído. Para amplificação utilizou-se de 1 ciclo à 94°C por 5 minutos, 34 ciclos à 94°C por 30 segundos, 57,7°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e 1 ciclo final à 72°C por 10 minutos seguido de eletroforese com a aplicação de 10 µL do amplificado em gel de agarose à 1%.

4.7.2 PCR's CONVENCIONAIS ESPÉCIE-ESPECÍFICAS

As amostras positivas, na PCR convencional para a classe *Mollicutes* foram submetidas a mesma técnica utilizando *primers* espécie-específicos. Para o micro-organismo *M. agalactiae* utilizou os oligonucleotídeos iniciadores descrito por Chavez-Gonzáles et al. (1995). Para o volume final de reação de 25 µL, utilizou-se: 2,5 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 0,7 µL MgCl₂ (50 mM); 4 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 0,5 µL de cada *primer* (50 pmol), 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen™) e 1 µL de DNA extraído. Para amplificação utilizou-se de 1 ciclo à 94°C por 5 minutos, 35 ciclos à 94°C por 45 segundos, 58°C por 60 segundos e 72°C por 120 segundos e 1 ciclo final à 72°C por 10 minutos seguido de eletroforese com a aplicação de 10 µL do amplificado em gel de agarose à 1%.

Para a detecção de *M. conjunctivae* foram utilizados os *primers* descritos por Giacometti et al.; 1999, e para a reação com volume final de 25 µL utilizou-se: 2,5 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 0,75 µL MgCl₂ (50 mM); 4 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 0,5 µL de cada *primer*

(10 pmol), 2,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen™) e 2 µL de DNA extraído. Para amplificação utilizou-se de 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, 35 ciclos à 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos e 1 ciclo final à 72°C por 10 minutos seguido de eletroforese com a aplicação de 10 µL do amplificado em gel de agarose à 1%.

No caso de *M. capricolum* subsp. *capricolum* os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção por PCR convencional foram aqueles descritos por Monnerat et al., 1999a, no qual para a reação de volume final 25 µL utiliza-se: 2,5 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 0,75 µL MgCl₂ (50 mM); 4 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 1 µL de cada *primer* (20 pmol), 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen™) e 2 µL de DNA extraído. Para amplificação utilizou-se de 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, 35 ciclos à 94°C por 30 segundos, 51°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos e 1 ciclo final à 72°C por 10 minutos seguido de eletroforese com a aplicação de 10 µL do amplificado em gel de agarose à 1%.

Para a detecção de *M. mycoides* subsp. *capri* por PCR convencional foram utilizados os *primers* descritos por Monnerat et al., 1999b. Para a reação de volume final de 25 µL utiliza-se: 2,5 µL de tampão para PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 2 µL MgCl₂ (50 mM); 4 µL de solução de desoxiribonucleotídeos (1,0 mM); 0,5 µL de cada *primer* (20 pmol), 1,0 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen™) e 2 µL de DNA extraído. Para amplificação utilizou-se de 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, 35 ciclos à 94°C por 30 segundos, 49°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e 1 ciclo final à 72°C por 10 minutos seguido de eletroforese com a aplicação de 10 µL do amplificado em gel de agarose à 1%.

Quadro 2: Primers específicos para detecção das espécies alvo de Micoplasmas, sequências e tamanho do produto amplificado.

Espécie	Primers	Sequências	Produto	Referência
<i>M. agalactiae</i>	MagF	5'-CCTTTTAGATTGGGATAGCGGATG-3'	270pb	Chavez-González et al., 1995.
	MagR	5'-CCGTCAAGGTAGCGTCATTTCTTAC-3'		
<i>M. conjunctivae</i>	McoF1	5'-GTATCTTTAGAGTCCTCGTCTTTCAC-3'	750pb	Giacometti et al., 1999.
	McoR1	5'-CAGCGTGCAGGATGAAATCCCTC-3'		
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	MCCPL1-L	5'-AGACCCAAATAAGCCATCCA-3'	1356pb	Monnerat et al., 1999a.
	MCCPL1-R	5'-CTTTCACCGCTTGTTGAATG-3'		
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	MMMLC2-L	5'-CAATCCAGATCATAAAAAACCT-3'	1049pb	Monnerat et al., 1999b.
	MMMLC1-R	5'-CTCCTCATATTCCTTAGAA-3'		

4.7.3 qPCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA

A PCR em tempo real (qPCR) foi utilizada para a detecção de *M. c. capripneumoniae* por qPCR SYBR-Green® com os *primers* descritos por Fitzmaurice et al., (2008) Tabela 2. Em reação com volume final de 25 µL utilizou-se: 12,5 µL de SYBR-Green® (Applied Biosystems®), 2,5 µL de cada *primers* (100nM), 4 µL de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de DNA extraído. No termocilador aplicou-se 1 ciclo de 95°C por 2 minutos, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e um ciclo de 72°C por 1 min. A temperatura de *melting* foi calculada durante a elevação da temperatura entre 60°C e 90°C a cada 1°C.

Quadro 3: Primers específicos para detecção de *M. capricolum capripneumoniae*, sequências e tamanho do produto amplificado.

Espécie	Primers	Sequências	Produto	Referência
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	MccpF	5'-CGCTCACATAGCCAATCATC-3'	152 pb	Fitzmaurice et al., 2008.
	MccpR	5'-TCGTTTTTAAGAGAAAATCAAGCA-3'		

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações obtidas após a aplicação dos questionários epidemiológicos foram organizadas em forma de planilha, e com auxílio do programa SPSS 16.0. Foram calculadas as frequências de cada variável observada, além da execução dos testes de χ^2 (qui-quadrado) e a razão de chances (odds ratio), com nível de significância de 5% (Siegel & Castellan Jr., 2006) e intervalo de confiança de 95%, nas associações entre o resultado da detecção molecular nas amostras coletadas e as variáveis de interesse.

5. RESULTADOS

As propriedades participantes eram constituídas de 70% (7/10) das criações destinadas ao corte e 30% (3/10) ao leite. Sobre a finalidade das propriedades observou-se que 80% (8/10) possuíam criações comerciais e as outras 20% (2/10) de subsistência. Noventa por cento (9/10) delas adotavam o sistema intensivo de criação enquanto 10% (1/10) o sistema extensivo. Nos casos das características das propriedades o número de animais totaliza 115 e 10 propriedades devido a falta de dados coletados referentes às propriedades 2 e 6.

Com relação às características de origem dos animais observou-se que com relação ao tipo de exploração 65,2% (75/115) dos animais estudados pertenciam a propriedades de corte e 34,8% (40/115) de propriedades de leite. Quanto à finalidade da criação 85,2% (98/115) pertenciam a propriedades comerciais e 14,8% (17/115) a propriedades de subsistência e, referente ao formato de criação adotado pelas propriedades, 91,3% (105/115) utilizavam o sistema de criação intensiva e 8,7% (10/115) de criação extensiva (Tabela 2).

Já sobre as características individuais dos animais coletados observou-se que quanto ao sexo, 21,2% (28/132) eram machos, enquanto 78,8% (104/132) eram fêmeas. Quanto a alterações de seus linfonodos, 22,7% (30/132), 13,6% (18/132) e 6,8% (9/132) dos animais apresentavam linfonodos pré escapular, iguinal e submandibulares respectivamente alterados. Entretanto apenas 2,3% (3/132) apresentaram alterações como chiados e estertores na auscultação pulmonar, 9,8% (13/132) apresentaram mucosa genital congesta e 9,8% (13/132) apresentaram mucosa ocular hiperêmica nas avaliações clínicas durante a coleta das amostras (Tabela 3).

Tabela 2: Frequência das variáveis nas propriedades de origem dos animais dos quais se coletou amostras analisadas.

Variáveis Propriedades		Número de animais	Total (%)
Tipo de Exploração	Corte	75	65,2
	Leite	40	34,8
	Total	115	100,0
Finalidade	Comercial	98	85,2
	Subsistência	17	14,8
	Total	115	100,0
Tipo de Criação	Intensivo	105	91,3
	Extensivo	10	8,7
	Total	115	100,0

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E.; ALMEIDA, C. S. D. (2016)

Tabela 3: Frequência das variáveis individuais dos animais dos quais se coletou amostras posteriormente analisadas.

Variáveis Individuais		Número de animais	Total (%)
Sexo	Macho	28	21,2
	Fêmea	104	78,8
	Total	132	100,0
Linfonodo Pré-escapular	Alterado	30	22,7
	Normal	102	77,3
	Total	132	100,0
Linfonodo Inguinal	Alterado	18	13,6
	Normal	114	86,4
	Total	132	100,0
Linfonodo Submandibular	Alterado	9	6,8
	Normal	123	93,2
	Total	132	100,0
Auscultação Pulmonar	Alterada	3	2,3
	Normal	129	97,7
	Total	132	100,0
Mucosa Genital	Congesta	13	9,8
	Normal	119	90,2
	Total	132	100,0
Mucosa Ocular	Congesta	13	9,8
	Normal	119	90,2
	Total	132	100,0

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E.; ALMEIDA, C. S. D. (2016)

Quanto aos resultados das análises moleculares, realizou-se também o calculo das frequências observadas contatando-se 67,4% (89/132) das amostras nasais, 20,8% (26/125) das genitais e 6,8% (9/132) das amostras oculares testadas por PCR convencional para detecção de micro-organismos da classe *Mollicutes* positivas (sete amostras genitais se perderam no transporte entre a coleta e as analises laboratoriais) (Tabela 4). Os *amplicons* resultantes das amostras

amplificadas pelos *primers* genéricos para a classe *Mollicutes* apresentaram fragmentos de aproximadamente 288 pb (Figura 2).

Tabela 4: Detecção de *Mollicutes* pela PCR convencional em materiais clínico obtidos de secreções nasais, genitais e oculares respectivamente – Bahia.

PCR convencional classe <i>Mollicutes</i>		Número de animais	Total (%)
Amostras Nasais	Positiva	89	67,4
	Negativa	43	34,8
	Total	132	100,0
Amostras Genitais	Positiva	26	20,8
	Negativa	99	79,2
	Total	125	100,0
Amostras Oculares	Positiva	9	6,8
	Negativa	123	93,2
	Total	132	100,0

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E. (2016)

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando primers GPO3 e MGSO para classe *Mollicutes*. Colunas 1 a 13 amostras de conjuntiva nasal, C- (controle negativo), C+ (controle positivo), PM (peso molecular 100pb).

Das amostras testadas por PCR convencional espécie-específica os resultados foram positivos em: 1,5% (2/132) nas amostras oculares para *M.*

conjunctivae, assim como 4,5% (6/132) nas amostras nasais para *M. agalactiae*. No entanto nos casos de PCR convencional espécie-específica para *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* e na qPCR espécie-específica para *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* não detectou-se o alvo do DNA do micro-organismo (tabela 5). Os controles positivos e negativos das PCRs apresentaram resultados esperados.

Tabela 5: : Percentagem e detecção de *M. agalactiae*, *M. conjunctivae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* pela PCR convencional em materiais clínico obtidos de secreções nasais, genitais. Bahia

PCR's e qPCR espécie-específicas		Número de animais		Total (%)
		Positivo (%)	Negativo (%)	
Amostras Nasais	<i>Ma</i>	6 (4,5)	126 (95,5)	132 (100)
	<i>Mc</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mmc</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mcc</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mccp</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
Amostras Genitais	<i>Ma</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mc</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mmc</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mcc</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mccp</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
Amostras Oculares	<i>Ma</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mc</i>	2 (1,5)	130 (98,5)	132 (100)
	<i>Mmc</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mcc</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)
	<i>Mccp</i>	0 (0,0)	132 (100,0)	132 (100)

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E. (2016)

Legenda: (Positivo): Detecção do DNA alvo do respectivo micoplasma; (Negativo): Ausência do DNA alvo do respectivo micoplasmas; (*Ma*): *M. agalactiae*; (*Mc*): *M. conjunctivae*; (*Mmc*): *M. mycoides* subsp. *capri*; (*Mcc*): *M. capricolum* subsp. *capricolum*; (*Mccp*): *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*.

Foram calculadas as associações epidemiológicas entre os resultados das PCR's e as variáveis referentes às características individuais dos animais assim como sobre as características das propriedades as quais esses animais pertenciam.

De todas as associações analisadas referentes às PCR's convencionais para classe *Mollicutes* constatou-se apenas, relação positiva entre animais provenientes de sistema intensivo de criação e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras nasais (OR: 6,417; IC: 1,551 – 26,546) (Tabela 6). Associação positiva foi observada entre animais oriundos de propriedades com exploração leiteira e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras oculares (OR: 6,441; IC: 1,235-33,581) (Tabela 7).

Além de relação positiva entre animais provenientes de sistema extensivo de criação e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras genitais (OR: 3,900; IC: 1,028 – 14,796) (Tabela 8), no caso específico das amostras genitais o numero total de animais provenientes de propriedades de sistema de criação conhecidos que tiveram amostras genitais coletadas totalizaram 108, em razão da falta de dados fornecidos pelas propriedades 2 e 6, além de mais 7 amostras que se perderam no transporte entre a coleta e a análise laboratorial. Entretanto não houve outra correlação epidemiológica estatisticamente significativa entre o resultado das PCR's convencionais para Classe *Mollicutes* e as outras variáveis analisadas.

Tabela 6: Associação entre as variáveis de interesse e resultado da PCR convencional para detecção de micro-organismos da classe classe *Mollicutes* em amostras nasais – Bahia.

Variáveis Analisadas		PCR Convencional Classe <i>Mollicutes</i> Amostras Nasais		Total	Odds Ratio	IC 95%	P
		Negativo	Positivo				
Auscultação Pulmonar	Normal	42	87	129	0,966	0,085-10,951	1,000*
	Alterada	1	2	3			
	Total	43	89	132			
Mucosa Genital	Normal	39	80	119	1,097	0,318-3,784	1,000*
	Congesta	4	9	13			
	Total	43	89	132			
Mucosa Ocular	Normal	38	81	119	0,751	0,230-2,448	0,869
	Congesta	5	8	13			
	Total	43	89	132			
Linfonodo Pré-escapular	Normal	33	69	102	0,957	0,403-2,272	0,920
	Alterado	10	20	30			
	Total	43	89	132			
Linfonodo Inguinal	Normal	34	80	114	0,425	0,155-1,164	0,090
	Alterado	9	9	18			
	Total	43	89	132			
Linfonodo Submandibular	Normal	41	82	123	1,750	0,348-8,804	0,750*
	Alterado	2	7	9			
	Total	43	89	132			
Histórico de Secreção Nasal	Ausente	19	53	72	0,605	0,269-1,361	0,222
	Presente	16	27	43			
	Total	35	80	115			
Tipo de Exploração	Corte	21	54	75	0,722	0,317-1,644	0,437
	Leite	14	26	40			
	Total	35	80	115			
Finalidade	Subsistência	4	13	17	0,665	0,201-2,205	0,700*
	Comercial	31	67	98			
	Total	35	80	115			
Tipo de Criação	Extensivo	7	3	10	6,417	1,551-26,546	0,013*
	Intensivo	28	77	115			
	Total	35	80	115			

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E. (2016)

*: p-valor com correção de continuidade

Tabela 7: Associação entre as variáveis de interesse e resultados da PCR convencional para detecção de micro-organismos da classe *Mollicutes* em amostras oculares - Bahia.

Variáveis Analisadas		PCR Convencional Classe <i>Mollicutes</i> Amostras Oculares		Total	Odds Ratio	IC 95%	P
		Negativo	Positivo				
Auscultação Pulmonar	Normal	120	9	129			
	Alterada	3	0	3	--	--	--
	Total	123	9	132			
Mucosa Genital	Normal	110	9	119			
	Congesta	13	0	13	--	--	--
	Total	123	9	132			
Mucosa Ocular	Normal	110	9	119			
	Congesta	13	0	13	--	--	--
	Total	123	9	132			
Linfonodo Pré-escapular	Normal	94	8	102			
	Alterado	29	1	30	0,405	0,049 - 3,376	0,653*
	Total	123	9	132			
Linfonodo Inguinal	Normal	105	9	114			
	Alterado	18	0	18	--	--	--
	Total	123	9	132			
Linfonodo Submandibular	Normal	114	9	123			
	Alterado	9	0	9	--	--	--
	Total	123	9	132			
Histórico de Secreção Nasal	Ausente	66	6	72			
	Presente	41	2	43	0,537	0,103-2,786	0,710*
	Total	107	8	115			
Tipo de Exploração	Corte	73	2	75			
	Leite	34	6	40	6,441	1,235-33,581	0,037*
	Total	107	8	115			
Finalidade	Subsistência	17	0	17			
	Comercial	90	8	98	--	--	--
	Total	107	8	115			
Tipo de Criação	Intensivo	97	8	105			
	Extensivo	10	0	10	--	--	--
	Total	107	8	115			

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E. (2016)

*: p-valor com correção de continuidade

Tabela 8: Associação entre as variáveis de interesse e resultados da PCR convencional para detecção de micro-organismos classe *Mollicutes* em amostras genitais - Bahia.

Variáveis Analisadas		PCR Convencional Classe <i>Mollicutes</i> Amostras Genitais		Total	Odds Ratio	IC 95%	P
		Negativo	Positivo				
Auscultação Pulmonar	Normal	97	25	122			
	Alterada	2	1	3	1,940	0,169-22,266	1,000*
	Total	99	26	125			
Mucosa Genital	Normal	89	23	112			
	Congesta	10	3	13	1,161	0,295-4,565	1,000*
	Total	99	26	125			
Mucosa Ocular	Normal	88	25	113			
	Congesta	11	1	12	0,320	0,039-2,600	0,456*
	Total	99	26	125			
Linfonodo Pré-escapular	Normal	77	19	96			
	Alterado	22	7	29	1,289	0,480-3,462	0,613
	Total	99	26	125			
Linfonodo Inguinal	Normal	83	24	107			
	Alterado	16	2	18	0,432	0,093-2,014	0,435*
	Total	99	26	125			
Linfonodo Submandibular	Normal	93	24	117			
	Alterado	6	2	8	1,292	0,245-6,807	1,000*
	Total	99	26	125			
Histórico de Secreção Nasal*	Ausente	48	17	65			
	Presente	35	8	43	0,645	0,250-1,663	0,363
	Total	83	25	108			
Tipo de Exploração	Corte	56	14	70			
	Leite	27	11	38	1,630	0,654-4,063	0,292
	Total	83	25	108			
Finalidade	Subsistência	16	1	17			
	Comercial	67	24	91	5,731	0,721-45,574	0,127*
	Total	83	25	108			
Tipo de Criação	Intensivo	78	20	98			
	Extensivo	5	5	10	3,900	1,028-14-796	0,035
	Total	83	25	108			

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E. (2016)

*: p-valor com correção de continuidade

Não foi observado associação estatisticamente significativa quando analisou-se a correlação entre as variáveis de interesse e o resultado das PCR convencionais para *M. agalactiae* em amostras nasais e para *M. conjunctivae* em amostras oculares, como apresentado nas tabelas 9 e 10. Na ausência de ao menos uma amostra positiva os cálculos estatísticos são impossíveis, fato que ocorreu nos casos das associações entre as variáveis e as PCR's para *M. agalactiae* nas amostras oculares e genitais e *M. conjunctivae* nas amostras nasais e genitais, assim como para *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* em todas as amostras testadas.

Tabela 9: Associação entre as variáveis de interesse e resultados da PCR convencional para *M. agalactiae* em amostras nasais - Bahia.

Variáveis Analisadas		PCR para <i>M. agalactiae</i> Amostras Nasais		Total	Odds Ratio	IC 95%	P
		Negativo	Positivo				
Auscultação Pulmonar	Normal	123	6	129			
	Alterada	3	0	3	--	--	--
	Total	126	6	132			
Mucosa Genital	Normal	113	6	119			
	Congesta	13	0	13	--	--	--
	Total	126	6	132			
Mucosa Ocular	Normal	114	5	119			
	Congesta	12	1	13	1,900	0,205-17,633	1,000*
	Total	126	6	132			
Linfonodo Pré-escapular	Normal	99	3	102			
	Alterado	27	3	30	3,667	0,700-19,206	0,257*
	Total	126	6	132			
Linfonodo Inguinal	Normal	108	6	114			
	Alterado	18	0	18	--	--	--
	Total	126	6	132			
Linfonodo Submandibular	Normal	117	6	123			
	Alterado	9	0	9	--	--	--
	Total	126	6	132			
Histórico de Secreção Nasal	Ausente	66	6	72			
	Presente	43	0	43	--	--	--
	Total	109	6	115			
Tipo de Exploração	Corte	73	2	75			
	Leite	36	4	40	4,056	0,709-23,191	0,213*
	Total	109	6	115			
Finalidade	Subsistência	17	0	17			
	Comercial	92	6	98	--	--	--
	Total	109	6	115			
Tipo de Criação	Intensivo	99	6	105			
	Extensivo	10	0	10	--	--	--
	Total	109	6	115			

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E. (2016)

*: p-valor com correção de continuidade

Tabela 10: Associação entre as variáveis de interesse e os resultados PCR convencional para *M. conjunctivae* em amostras oculares - Bahia.

Variáveis Analisadas		PCR para <i>M. conjunctivae</i> Amostras Oculares		Total	Odds Ratio	IC 95%	P
		Negativo	Positivo				
Auscultação Pulmonar	Normal	127	2	129			
	Alterada	3	0	3	--	--	--
	Total	130	2	132			
Mucosa Genital	Normal	117	2	119			
	Congesta	13	0	13	--	--	--
	Total	130	2	132			
Mucosa Ocular	Normal	117	2	119			
	Congesta	13	0	13	1,900	0,205-17,633	1,000*
	Total	130	2	132			
Linfonodo Pré-escapular	Normal	100	2	102			
	Alterado	30	0	30	3,667	0,700-19,206	0,257*
	Total	130	2	132			
Linfonodo Submandibular	Normal	121	2	123			
	Alterado	9	0	9	--	--	--
	Total	130	2	132			
Histórico de Secreção Nasal	Ausente	72	0	72			
	Presente	42	1	43	--	--	--
	Total	114	1	115			
Tipo de Exploração	Corte	75	0	76			
	Leite	39	1	40	--	--	--
	Total	114	1	115			
Finalidade	Subsistência	17	0	17			
	Comercial	97	1	98	--	--	--
	Total	114	1	115			
Tipo de Criação	Intensivo	104	1	105			
	Extensivo	10	0	10	--	--	--
	Total	114	1	115			

Fonte: CASTILHO JUNIOR, R.E. (2016)

*: p-valor com correção de continuidade

6. DISCUSSÃO

As micoplasmoses se apresentam como importantes enfermidades na caprinocultura, com grande impacto socioeconômico nas populações que dependem desse tipo de criação como fonte de renda (OLIVEIRA et al., 2004). Isso aliado às falhas na detecção e ao manejo precário pode acarretar um importante problema social e econômico (COELHO et al. 2011; CÂMARA, SILVA e GUERRA, 2015). A região do nordeste brasileiro onde se encontram mais de 90% da população caprina nacional pode ser afetada diretamente por disseminação descontrolada desses micro-organismos (IBGE, 2012). A necessidade na identificação dos micoplasmas, principalmente nessas regiões, torna-se indispensável para melhor compreensão da situação epidemiológica em que se encontram (ALBUQUERQUE et al., 2014; CAMARA, SILVA e GUERRA, 2015). Esta informação deve ser utilizada para divulgação e conscientização de criadores e autoridades no intuito de salientar a importância da intensificação do controle sanitário dos animais e da necessidade da implantação de *Mollicutes* no rebanho minimizando ou até mesmo evitando sua disseminação e reduzindo os prejuízos associados a infecção.

As propriedades estudadas no presente estudo, eram em sua maioria destinadas ao corte, perfil semelhante ao encontrado no estado de Pernambuco por Coelho et al. (2011). Diferentemente da observação usual nos estudos em populações de caprinos no nordeste brasileiro com predominância do sistema extensivo de criação (COSTA et al., 2008; FILGEIRA et al., 2009; COELHO et al., 2011; SOUZA et al. 2013; ALBUQUERQUE et al., 2014), o presente estudo envolveu maior parcela de propriedades que adotaram sistema intensivo com finalidade comercial. Esta condição se deve principalmente ao fato de que as

propriedades estudadas participam no programa de assistência oferecida pelo projeto de extensão da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Essa migração de criadores para o sistema intensivo de criação havia sido relatada por Albuquerque et al. (2014), pelo interesse na criação de raças exóticas, implantação de tecnologia e busca de melhorias no manejo e nos lucros.

Os animais do estudo, em geral, eram animais saudáveis e raramente apresentavam manifestações clínicas. As manifestações clínicas mais frequentes foram a congestão de mucosa nasal e ocular. Filgueira et al., (2009) e Coelho et al. (2011), diferente do presente estudo, encontraram taxas relativamente altas de enfermidades nos animais estudados. Essa aparente sanidade dos rebanhos estudados provavelmente pode estar relacionada à implantação do sistema intensivo e o caráter comercial das propriedades que praticam o manejo sanitário de maneira mais elaborada (JESUS JUNIOR; RODRIGUES; MORAES, 2010).

No presente estudo verificou-se altas frequências de animais positivos na PCR para Classe *Mollicutes*, principalmente nas amostras nasais e genitais. Entretanto esse dado deve ser interpretado com cautela, uma vez que esses micro-organismos podem fazer parte da microbiota normal destes animais, ou ainda, se relacionar de forma comensal com seu hospedeiro não estimulando o desenvolvimento de manifestações clínicas (RAZIN & HAYFLICK, 2010). Esse perfil com elevada frequência de integrantes da classe *Mollicutes* em animais saudáveis clinicamente foi descrito no estado do Rio de Janeiro por Barbosa et al. (2000). A frequência observada de *Mollicutes* nos animais do presente estudo é baixa quando comparada com os últimos estudos sobre o tema que relataram prevalências superiores a 56% e 10% em rebanhos no estado da Paraíba e Sergipe respectivamente (ALCÂNTARA et al., 2010; SANTOS et al. 2015). Apesar de

obtermos frequências de *Mollicutes* inferiores, evidenciamos que estes micro-organismos continuam presentes no Brasil e distribuídos diferentemente entre os materiais clínicos estudados.

A identificação de *M. agalactiae*, observada em seis amostras nasais testadas, pode representar baixa porcentagem (4,5%) nos dados brutos do presente estudo, porém demonstra a presença desse microrganismo na região estudada. Apesar de ter sido descrito há mais de 75 anos no Brasil (PENHA e D'APICE, 1942), é responsável pelo desenvolvimento de diversas manifestações clínicas, entre elas a Agalaxia Contagiosa (AC) caprina, além de representar importante relevância econômica ainda pode ser encontrado em diversos estados brasileiros (CONTRERAS, 2003; AZEVEDO et al. 2006; CORRALES, 2007; OIE, 2014; SANTOS et al. 2015).

Quanto à detecção de *M. conjunctivae* em dois animais, ainda que represente uma porcentagem muito baixa de identificação no rebanho, possui extrema relevância para os dados de bibliografias nacionais, isso devido principalmente a suas características patogênicas e capacidade de promoção de desenvolvimento de alterações clínicas, principalmente oftalmológicas, como a Ceratoconjuntivite Infeciosa em caprinos (CIC) e cegueira em casos mais avançados (GIACOMETTI et al., 2002; CALDERON-COPETE et al., 2009; MARCO et al., 2009; MAVROT et al., 2012). Gregory et al. (2003), identificaram pela primeira vez a presença desse micro-organismo em caprinos no Brasil e, ao nosso conhecimento, não houve mais relatos na literatura nacional de sua ocorrência em caprinos. Essa constatação corrobora com as conclusões de Câmara, Silva e Guerra (2015), que afirmam existir falha na detecção de micoplasmas. Neste contexto inclui-se a falta de padronização nos limites indicativos da presença da infecção e ao

manejo sanitário precário do rebanho caprino do nordeste brasileiro (PINHEIRO, ALVES e HADDAD, 2000; PEIXOTO, MOTA E DA COSTA, 2010), desse modo, sugere-se que a não identificação desse microrganismo esteja mais relacionada a uma escassez de estudos e pesquisas sobre o assunto, do que propriamente a uma sanidade do rebanho.

No presente estudo não foi possível detectar a presença de integrantes do *cluster mycoides* nas amostras estudadas. Apesar de ter sido descrito anteriormente, *M. mycoides* subsp. *capri* não é isolado há 30 anos no Brasil (NASCIMENTO et al. 1986). Quanto a *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* até a presente data não houve descrição da presença desses micro-organismos na América Latina (NICHOLAS et al. 2008), tornando esse resultado esperado. A ocorrência extremamente baixa ou ainda ausência de estudos nacionais mais abrangentes pode justificar a não detecção desses micro-organismos, sendo necessária uma cooperação conjunta de diversos grupos de pesquisa a fim de elucidar melhor o perfil das micoplasmoses caprinas no Brasil.

Sobre as relações epidemiológicas analisadas constatou-se associação positiva entre animais provenientes do sistema de intensiva de criação e resultados positivos pela PCR convencional para classe *Mollicutes* em amostras nasais (OR: 6,417; IC: 1,551 – 26,546). Esse dado sugere que a maior proximidade entre os animais, decorrente do sistema de criação ou tipo de exploração, pode aumentar significativamente o risco da presença de *Mollicutes* em sua microbiota, uma vez que, grande parte desses micro-organismos pode ser transmitidos via contato direto (GIACOMETTI et al. 2002; AZEVEDO et al. 2006, BERGEY'S, 2010; NICHOLAS e CHURCHWARD, 2012; YU et al., 2013; KUMAR et al., 2014). Estatisticamente outra

relação epidemiológica positiva observada pela presente pesquisa foi na associação entre animais oriundos de propriedades com exploração leiteira e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras oculares (OR: 6,441; IC: 1,235-33,581), porém nesse caso, são necessários mais estudos sobre o tema para melhor compreensão dessa relação.

O presente estudo também evidenciou a relação positiva entre animais provindos de sistema extensivo de criação e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras genitais (OR: 3,900; IC: 1,028 – 14,796). Este achado pode sugerir que devido ao menor controle sexual de animais em sistema extensivo de criação, haja um favorecimento da disseminação de micro-organismos que colonizem as mucosas do trato reprodutivo e afetando diretamente a produtividade, reforçando os dados observados por Santos et al. (2011) em rebanhos do Estado da Paraíba. Coelho et al. (2011) mencionam que existe grande negligência pessoal e governamental sobre rebanhos menores que em sua maioria praticam o modelo extensivo; são nas propriedades de criação extensiva onde mais frequentemente ocorrem as principais enfermidades que acometem a caprinocultura (PINHEIRO, ALVES e HADDAD, 2000). Contudo, mais uma vez, seriam necessários mais estudos com foco na epidemiologia dos micoplasmas em caprinos para confirmar tais hipóteses e alcançar um maior entendimento desse tipo de relação.

Com base nos resultados obtidos pelo estudo é possível compreender inicialmente, a importância econômica, social e cultural da caprinocultura na região nordeste no Brasil (MORAES NETO, 2003; COSTA et al. 2008; IBGE, 2012; APEDA, 2014). É possível perceber também, a tendência nos criadores com maior acesso a informação de iniciarem projetos de modernização nas propriedades no intuito de aprimorarem o manejo, ampliar os lucros e o número de seu rebanho

(ALBUQUERQUE et al. 2014). Sobre os resultados observados no diagnóstico da presença de micoplasmas, observa-se a falta de produção científica para fornecer dados epidemiológicos com foco na caprinocultura, que se mostra ainda maior quando se contempla identificação das espécies micoplasmas. Resultados como os obtidos na presente pesquisa com a identificação de *M. conjunctivae*, microorganismo descrito uma única vez na literatura nacional até o momento, salientam a necessidade de maiores pesquisas epidemiológicas sobre essas bactérias de relevância para a criação de caprinos. Por esse motivo, nosso trabalho é imprescindível para que medidas sanitárias sejam tomadas de maneira correta, de modo a propiciar rebanhos mais saudáveis e rentáveis, assegurando melhores condições de vida para os produtores rurais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Detectou-se por PCR convencional ocorrência de micro-organismos da classe *Mollicutes* em 67,4%, 20,8% e 6,8% nas amostras nasais, genitais e oculares respectivamente, isto sugere que exista uma maior possibilidade de se identificar integrantes da classe *Mollicutes* em caprinos nas amostras de mucosa nasal.
- *M. agalactiae* foi identificado em 4,5% das amostras nasais testadas por PCR convencional espécie-específica, de forma que, apesar de estar presente na região estudada, representa uma pequena parcela dos *Mollicutes* presentes nas amostras nasais.
- Apesar da baixa ocorrência de *Mollicutes* em mucosas oculares salienta-se a importância da identificação, pela primeira vez desde 2003, de *M. conjunctivae* em caprinos do Brasil por PCR convencional espécie-específica pelo presente estudo.
- Com relação ao *cluster Mycoides*, nenhum de seus integrantes pesquisados, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp), *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc) e *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc), foi detectado nas amostras respiratórias, genitais e oculares nos caprinos estudados, possivelmente devido sua reconhecida baixa ocorrência nas Américas, assim como suas características da relação entre parasita e hospedeiro.
- Constatou-se relação positiva entre animais provenientes de sistema intensivo de criação e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras nasais (OR: 6,417; IC: 1,551 – 26,546; p=0,013), provavelmente relacionada à proximidade entre os animais nesse tipo de sistema de criação.

- Verificou-se relação positiva entre animais oriundos de propriedades com exploração leiteira e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras oculares (OR: 6,441; IC: 1,235-33,581; $p=0,037$). Novos estudos são indispensáveis para melhor interpretação deste fenômeno.
- Houve associação positiva entre animais provenientes de sistema extensivo de criação e a PCR convencional positiva para classe *Mollicutes* em amostras genitais (OR: 3,900; IC: 1,028 – 14,796; $p=0,035$), possivelmente relacionadas ao baixo controle sexual desse tipo de criação, porém novamente são necessários mais estudos para melhor compreensão dessa associação, assim como para confirmação de hipóteses.
- Não observou-se associação estatisticamente significante entre as variáveis e o resultado das PCR convencionais espécie-específicas para *M. agalactiae* em amostras nasais e para *M. conjunctivae* em amostras oculares, devido a baixa ocorrência dos micro-organismos.
- As micoplasmoses, ainda que pouco presentes, podem ser encontradas nas regiões do semi-árido baiano.
- Muitos outros estudos podem derivar dos dados observados pela presente pesquisa para melhor compreensão das doenças envolvidas e o desenvolvimento de técnicas de manejo adequado.

REFERÊNCIAS

ADEHAN, R.; AJUWAPE, A.T.P.; ADETOSOYE, A.I.; ALAKA, O.O. Characterization of *Mycoplasmas* isolated from pneumonic lungs of sheep and goats. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 1, p. 44-49, 2006.

ALBUQUERQUE, I. R. R.; GOIS, G. C.; CAMPOS, F. S. Perfil Sanitário de cabras lactantes da região de Senhor do Bonfim, Bahia. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.2, p.144-149, 2014.

ALCANTARA, M.D.A.; AZEVEDO, E.O. **SOROPREVALÊNCIA DA AGALAXIA CONTAGIOSA E VACINAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAPRINOS**. 2010. 64p. (Mestrado em Medicina Veterinária), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

ALMEIDA NETO, J.B.; SÁ, F.B.; BUZINHANI, M.; TIMENETSKY, J.; MOTA, R.A.; ALMEIDA, M.Z. Ocorrência de *Mycoplasma conjunctivae* em ovinos sadios e com ceratoconjuntivite infecciosa, no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.71, n.1, p.79-81, 2004.

AL-MOMANI, W.; NICHOLAS, R. A J.; ABO-SHEHADA, M. N. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. **Preventive veterinary medicine** v. 83, n. 1, p. 1–10, 2008.

AL-MOMANI, W.; HALABLAB, M.A.; ABO-SHEHADA, M.N.; MILES, K.; MCAULIFFE, L.; NICHOLAS, R.A.J. Isolation and molecular identification of small ruminant mycoplasmas in Jordan. **Small Ruminant Research** 65 :106–112, 2006.

AMIRBEKOV M.; MURVATULLOEV S.; FERRARI G. Contagious caprine pleuropneumonia detected for the first time in Tajikistan. **Transboundary Animal Diseases Bulletin**, 35, 20–22, 2010.

AMORES, J.; SÁNCHEZ, A.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J.C.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C. Viability of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* in goat milk samples stored under different conditions. **Veterinary Microbiology** 145, 347–350, 2010.

APEDA. Major Exporting Countries of Sheep/Goat Meat. 2014. Disponível em: < http://agriexchange.apeda.gov.in/product_profile/Major_Exporing_Countries.aspx?categorycode=0402 >. Acesso em: set/ 2015.

ARIZA-MIGUEL, J.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. A survey of *Mycoplasma agalactiae* in dairy sheep farms in Spain. **Veterinary Research** 8:171, 2012.

ARNAL, M.C.; HERRERO, J.; DE LA FE, C.; REVILLA, M.; PRADA, C.; MARTINEZ-DURAN, C.; GOMEZ-MARTIN, A.; FERNANDEZ-ARBERAS, O.; AMORES, J.; CONTRERAS, A.; GARCIA- SERRANO, A.; LUCO, D.F. Dynamics of an infectious keratoconjunctivitis outbreak by *Mycoplasma conjunctivae* on pyrenean chamois *rupicapra p. Pyrenaica*. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61887, 2013.

AWAN, M. A.; ABBAS, F.; YASINZAI, M.; NICHOLAS, R. A. J.; BABAR, S. ; AYLING, R. D.; ATTIQUE, M. A.; AHMED Z. Prevalence of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens* in goats in Pishin District of Balochistan. **Pakistan Veterinary Journal**. 29(4): 179-185, 2009.

AWAN, M. A.; ABBAS, F.; YASINZAI, M.; NICHOLAS, R.A.; BABAR, S.; AYLING, R.D.; ATTIQUE, M.A.; AHMED, Z.; WADOOD, A.; KHAN, F.A. First report on the molecular prevalence of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* (Mccp) in goats the cause of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) in Balochistan province of Pakistan. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 7, p. 3401-6, 2010.

AZEVEDO, E. O. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC) no Brasil**. 139 f. Tese (doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

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

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. DO; DANELLI, M. DAS G. M.; NASCIMENTO, M. DA G. F. DO; SANTOS, M. A. J. DOS; LIGNON, G. B.; RIBEIRO, V. R. Differentiation of *Mycoplasma mycoides* types on the

etiopathogeny of goat mycoplasmosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** v. 7, p. p33-p36, 2000.

BASCUÑANA, C. R.; MATTSSON, J.G.; BOLSKE, G.; JAHANSSON, K.E.. Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 9, p. 2577-86, May 1994.

BASHIRUDDIN, J. B.; TAYLOR, T. K.; GOULD, A. R. A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 6, 428- 434, 1994.

BECKER, C.A.; RAMOS, F., SELLAL, E., MOINE, S., POUMARAT, F., TARDY, F. Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. **Journal of Microbiological Methods** 90, 73–79, 2012.

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

BELLOY, L.; JANOVSKY, M.; VILEI, E.M.; PILO, P.; GIACOMETTI, M.; FREY, J. Molecular epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: transmission across species in natural outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1913-9, 2003.

BERGEY'S Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. **John Wiley & Sons, Inc. e Berguey's Manual Trust.**, 2015.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BROWNING, G.F.; WHITHEAR K.G.; GEARY. S.J. Vaccines to Control Mycoplasmosis. In: **Mycoplasmas: Molecular Biology, Pathogenicity, and Strategies for Control** (edited by Blanchard and Browning). Horizon Bioscience, Norfolk, UK, pp. 569–599, 2005.

CALDERON-COPETE, S.P.; FALQUET, L.; WIGGER, G.; WUNDERLIN, C.; SCHMIDHEINI, T.; FREY, J. The *Mycoplasma conjunctivae* genome sequencing, annotation and analysis. **National Center of Biotechnology Information.**, 2009.

CÂMARA, D.; SILVA, S.; GUERRA, M. Contagious agalactia. A "new" problem to goats and sheep of the Brazil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 18, n. 2, p. 34-38, 2015.

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

CAMPOS, A.C.; AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; SILVA, R.B.S.; CORDEIRO, A.A.; MAMEDE, A.G.; MELO, M.A.; NASCIMENTO, E. R.; CASTRO, R.S. Efficiency of inactive vaccines against contagious agalactia in Brazil [Eficiência de vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa no Brasil] **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.5, p.1394-1402, 2013.

CARDOSO, M. V.; LARA, M. C. C. S. H.; CHIEBAO, D.; GABRIEL, F. H. L.; VILLALOBOS, E. M. C.; PAULIN, L. M.; CASTRO, V.; NASSAR, A.; CUNHA, E. M. S.; PIATTI, R. M.; PITUCO, E. M. Determinação da condição sanitária de rebanhos caprinos e ovinos na região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. **35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 2008.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Y. R.; ROS-BASCUÑANA, C.; BÖLSKE, G.; MATTSSON, J. G.; FERNÁNDEZ-MOLINA, C.; 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.

CHAZEL, M.; TARDY, F.; LE GRAND, D.; CALAVAS, D.; POUMARAT, F. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. **BMC Veterinary Research**, v. 6, p. 1-8, 2010.

CHU, Y.; GAO,P.; ZHAO,P. HE, Y.; LIAO, N.; JACKMAN, S.; ZHAO,Y.; BIROL, I.; DUAN, X.; LU Z. Genome Sequence of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Strain M1601. **Journal of Bacteriology**, p. 6098–6099 Vol. 193, No. 21, 2011.

COELHO, M. C. S. C.; SOUZA, V.C.; COELHO, M.I.S.; CUNHA, M.P.; MEDINA, F.T. Aspectos sanitários de rebanhos caprinos e ovinos criados em assentamentos no município de Petrolina-PE. **Revista Semiárido De Visu**, v. 1, n. 1, p. 32-40, 2011.

COMSTOCK, L.E.; KASPER, D.L. Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. **Cell** 126: 847–850, 2006.

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

CORRALES J.C., ESNAL A., DE LA FEA C., SANCHEZ A., ASSUNÇÃO P.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research** v. 68, n. Issues 1–2, p. 154–166, 2007.

COSTA, R. G.; ALMEIDA, C.C.; PIMENTA FILHO, E.C.; HOLANDA JR, E.V.; SANTOS, N.M. Caracterização do sistema de produção caprino. **Archivos Zootecnia**, v. 57 (218), p. 195-205, 2008.

DE LA FE, C.; ASSUNCAO, P.; SAAVEDRA, P.; TOLA, S.; POVEDA C.; POVEDA. J. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. **Vaccine** 25: 2340–2345, 2007a.

DE LA FE, C.; GUTIÉRREZ A.; POVEDA J.B.; ASSUNÇÃO P.; RAMÍREZ A.S.; FABELLO F. First isolation of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, one of the causal agents of caprine contagious agalactia, on the island of Lanzarote (Spain). **The Veterinary Journal** 173 440–442, 2007b.

DE LA FE C.; AMORES J.; GÓMEZ-MARTÍN A.; SÁNCHEZ A.; CONTRERAS A.; CORRALES J.C. *Mycoplasma agalactiae* detected in the semen of goat bucks. **Theriogenology** 72:1278–81, 2009.

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**, 2015.

DEGIORGIS, M. P.; OBRECHT, E.; RYSER, A.; GIACOMETTI, M. The possible role of eye-frequenting flies in the transmission of *Mycoplasma conjunctivae*. **Bulletin Society Entomology Suisse** 72:189–194, 1999.

DELLA LIBERA, A. M. M. P.; AZEDO, M. R.; BLAGITZ, M. G. Mastite em Pequenos Ruminantes. **IV Encontro de Pesquisadores em Mastites (Anais), Botucatu (SP)**: 64-73 p. 2007.

EGWU G.O., NICHOLAS R.A.J., AMEH J.A. & BASHIRUDDIN J.B. Contagious bovine pleuropneumonia: An update. **Veterinary Bulletin** 66:875- 888, 1996.

FERNÁNDEZ-AGUILAR, X.; CABEZON, O.; MARCO, I.; MENTABERRE, G.; FREY J.; LAVIN, S.; LOPEZ-OLIVEIRA, J.R. *Mycoplasma conjunctivae* in domestic small ruminants from high mountain habitats in Northern Spain. **BMC Veterinary Research**, 9:253, 2013.

FILGUEIRA, T. M. B.; AHID, S. M. M.; SUASSUNA, A. C. D.; SOUZA, W. J.; FONSECA, Z. A. S. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na região da chapada do Apodi. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, 2009.

FILIOUSSIS, G.; GIADINIS, N.D.; PETRIDOU, E.J. Congenital polyarthritis in goat kids attributed to *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary Records**, v.169, p.364, 2011.

FITZMAURICE, J.; SEWELL, M.; MANSO-SILVÁN, L.; THIAUCOURT, F.; MCDONALD, W.L.; O'KEEFE, J.S. Real-time polymerase chain reaction assays for the detection of members of the *Mycoplasma mycoides* cluster. **New Zealand Veterinary Journal**, 56:1, 40-47, DOI: 10.1080/00480169.2008.36803, 2008.

GIACOMETTI, M.; NICOLET, J.; JOHANSSON, K.E.; NAGLIC, T.; DEGIORGIS, M.-P.; FREY, J. Detection and identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivitis by PCR based on the 16S rRNA gene. **Journal of Veterinary Medicine**. 46, 173–180, 1999.

GIACOMETTI, M.; JANOVSKY, M.; JENNY, H.; NICOLET, J.; BELLOY, L. *Mycoplasma conjunctivae* infection is not maintained in Alpine chamois in eastern Switzerland. **Journal of Wildlife Disease**. 38: 297–304, 2002.

GIL, M. C.; PEÑA, F. J.; HERMOSO DE MENDOZA, J.; GOMEZ, L. Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v. 50, n. 10, p. 484-7, Dec 2003.

GLASS, J.I.; LARTIGUE, C.; PFANNKUCH, C.; BADEN-TILLSON, H.; SMITH, H.O.; VENTER, J.C.; ROSKE, K.; WISE, K.S.; CALCUTT, M.J.; NELSON, W.C.; NIERMAN, W.C. *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* ATCC 27343, complete genome. **National Center of Biotechnology Information** , 2013.

GÓMEZ-MARTÍN A.; CORRALES J.C.; AMORES J.; SÁNCHEZ A.; CONTRERAS A.; PATERNA A.; DE LA FE C. Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies capri in semen. **Theriogenology** 77: 1252–6, 2012.

GÓMEZ-MARTÍN A, AMORES J, PATERNA A, DE LA FE C. Contagious agalactiae due to *Mycoplasma* spp. In small dairy ruminants: epidemiology and prospects for diagnosis and control. **Veterinary Journal** 198:48–56, 2013.

GÓMEZ-MARTÍN, A.; UCA, N.; VIEIRA, L.A.; GADEA, J.; CADENAS, 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**, 2015.

GREGORY L., C. M. V., BIRGEL JR. E.H., TEIXEIRA S.R. SOUZA R.M., PACHECO W.A. , BIRGEL E.H. , BENESI F.J. Surto de Ceratoconjutivite Infecciosa dos caprinos causada por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos, criados no estado de São Paulo . **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, p. v.70, n.2, p.179-181, abr./jun., 2003.

HEGDE, S.; HEGDE, S.; SPERGSE, J.; BRUNTHALER, R.; ROSENGARTEN, R.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. In vitro and in vivo cell invasion and systemic spreading of *Mycoplasma agalactiae* in the sheep infection model. **International journal of medical microbiology** 304(8): 1024–1031, 2014.

HEGDE, S.; HEGDE, S.; ZIMMERMANN, M.; FLOCK, M.; SPERGSE, J.; ROSENGARTEN, R.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. Simultaneous identification of potential pathogenicity factors of *Mycoplasma agalactiae* in the natural ovine host by negative selection. **Infection and Immunity** 83:2751–2761, 2015.

HELLER, M.; SCHWARZ, R.; NOE, G.; JORES, J.; FISCHER, A.; SCHUBERT, E.; SACHSE K.. First human case of severe septicaemia associated with *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* infection. **Journal of Medical Microbiology Case Reports**, 2015.

HERNANDEZ, L.; LOPEZ, J.; ST-JACQUES, M.; ONTIVEROS, L.; ACOSTA, J.; HANDEL, K. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* associated with goat respiratory disease and high flock mortality. **Canadian Veterinary Journal** 47:366–369, 2006.

HUTCHEON, D. Contagious pleuro-pneumonia in Angora goats. **Veterinary Journal**. v.13, 171–180, 1881.

HOSIE, B. D. **Infectious Keratoconjunctivitis. In Diseases of Sheep.** . Oxford: Oxford: Blackwell Publishing, 2007.

HOTZEL H.; SACHSE, K.; PFUTZNER, H. A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides cluster*. **Veterinary Microbiology**, vol. 49,no. 1-2, pp. 31–43, 1996.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. 68 ISBN 0101-4234, 2012.

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

JESUS JÚNIOR, C. de.; RODRIGUES, L. S.; MORAES, V. E. G. de. Ovinocaprincultura de corte: a convivência dos extremos. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 281-320, 2010.

KHAN, L. A.; LORIA, G. R.; RAMIREZ, A. S.; NICHOLAS, R. A. J.; MILES, R. J.; FIELDER, M. D. Biochemical characterisation of some non fermenting, non arginine hydrolyzing mycoplasmas of ruminants. **Veterinary Microbiology**, vol. 109, no. 1-2,pp. 129–134, 2004.

KHEZRI, M.; POURBAKHS, S. A.; ASHTARI A.; ROKHZAD B. A survey of *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants with contagious agalactiae syndrome in Iran- **Bangladesh Journal Veterinary Medicine**. 12 (1): 67-72, 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 Sci**, v. 2013.

KUMAR, A.; RAHAL, A.; CHAKRABORTY, S.; KUMAR, V.; DHAMA, K. *Mycoplasma agalactiae*, na Etiological Agent of Contagious Agalactiae in Small Ruminants: A Review. **Veterinary Medicine International**, v. 2014.

LORENZON, S.; MANSO-SILVÁN, L.; THIAUCOURT, F. Specific realtime PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. **Molecular and Cellular Probes**. 22: 324–328, 2008.

LORIA, G. R.; NICHOLAS, R. A. J. Contagious agalactia: The shepherd's nightmare. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 5–6, 2013.

MACMARTIN, D.A.; MACOWAN, K.J.; SWIFT, L.L. A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. **British Veterinary Journal**. 136, 507–515, 1980.

MADANAT, A.; ZENDULKOVÁ, D.; POSPÍŠIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. **Acta Veterinaria Brno**, v. 70, n. 4, p. 403–412, 2001.

MAIGRE, L.; CITTI, C.; MARENDI, M.; POUMARAT, F.; TARDY, F. Suppression-Subtractive Hybridization as a Strategy To Identify Taxon-Specific Sequences within the *Mycoplasma mycoides* Cluster. Design and Validation of an *M. capricolum* subsp. *capricolum*-Specific PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. vol. 46 no. 4 1307-131, 2008.

MANSO-SILVAN, L.; PERRIER, X.; THIAUCOURT, F. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 57: 2247-2258, 2007.

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, n. 6, p. 1353–1358, 2009.

MARCO, I.; MENTABERRE, G.; BALLESTEROS, C.; BISCHOF, D.F.; LAVIN, S.; VILEI, E.M. First Report of *Mycoplasma conjunctivae* from wild caprinae with infectious keratoconjunctivitis in the Pyrenees (NE Spain), **Journal of Wildlife Diseases**, 45, 238-241. 2009.

MAVROT, F.; VILEI, E.M.; MARREROS, N.; SIGNER, C.; FREY, J.; DEGIORGIS, M.P.R. Occurrence, quantification, and genotyping of *Mycoplasma conjunctivae* in wild Caprinae with and without infectious keratoconjunctivitis. **Journal of wildlife diseases**, v. 48, n. 3, p. 619-631, 2012.

MAYER, D.; DEGIORGIS, M.P.R.; MEYER, W.; NICOLET, J.; GIACOMETTI, M. Lesions associated with infectious keratoconjunctivitis in alpine ibex. **Journal of wildlife diseases**, v. 33, n. 3, p. 413-9, Jul 1997.

McAULIFFE, L.; ELLIS, R.J.; MILES, K.; AYLING, R.D.; NICHOLAS R.A.J. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. **Microbiology**, 2006.

MONNERAT, M.P.; THIAUCOURT, F.; NICOLET, J.; FREY, J. Comparative analysis of the lppA locus in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. **Veterinary Microbiology** 69 p.157±172, 1999a.

MONNERAT, M.P.; THIAUCOURT, F.; POVEDA, J.B.; NICOLET, J.; FREY, J. Genetic and Serological Analysis of Lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunologic**, p. 224–230, 1999b.

MORAES NETO, O. T., A. RODRIGUES, A.C.A. ALBUQUERQUE E S. MAYER. **Manual de capacitação de agentes de desenvolvimento rural (ADRs) para a Caprinovinocultura.**, 2003. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55150/1/Cartilha-Agentes-SEBRAE.pdf> >.

NAGLIĆ, T.; HAJSIG, D.; FREY, F.; SEOL, B.; BUSCH, K.; LOJKIC, M. Epidemiological and microbiological study of an outbreak of infectious keratoconjunctivitis in sheep. **Veterinary Record**, v. 147, n. 15, p. 72-75, 2000.

NASCIMENTO, E.R.; NASCIMENTO, M.G.F.; FREUNDT, E.A.; ANDERSEN, H.; Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. **Brazilian Veterinary Journal**, v.142, p.246, 1986.

NASCIMENTO, E.R.; BARRETO, M.L.; PLATENIK, M.O.; AZEVEDO, E.O.; TABOSA, I.M.; ALCÂNTARA, M.D.B.; ALMEIDA, J.F.; NASCIMENTO, M.G.F. Contagious agalactia by *Mycoplasmas agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: **Internal Congress Internacional Organization Mycoplasmaology (IOM)**. XIV, Vienna, p. 45-46, 2002.

NICHOLAS, R.A.J. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. **Small Ruminant Research** 45:145–149, 2002.

NICHOLAS, R., AYLING, R.; MCAULIFFE, L. Contagious caprine pleuropneumonia. *Mycoplasma Diseases of Ruminants*, **Common wealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK**. pp. 116–129, 2008.

NICHOLAS, R.; CHURCHWARD, C. Contagious caprine pleuropneumonia: new aspects of an old disease. **Transboundary and emerging diseases**, v. 59, n. 3, p. 189-196, 2012.

OIE Terrestrial Manual: Chapter 2.7.5. - **Contagious agalactia**, 2008.

OIE Terrestrial Manual 2014: Chapter 2.7.6. - **Contagious caprine pleuropneumonia**, 2014.

OLIVEIRA, A.A.; ALVES, F.S.; PINHEIRO, R. R.; CHAPAVALL, L.; PINHEIRO, A.A. Micoplasmoses em pequenos ruminantes. **Sobral : Embrapa Caprinos**, 2004.

PATERNA, A.; CONTRERAS, A.; GÓMEZ-MARTÍN A.; AMORES, J.; TATAY-DUALDE, J.; PRATS-VAN DER HAM, M.; CORRALES, J.C.; SÁNCHEZ, A.; DE LA FE C. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. **Small Ruminant Research** 121:36–41, 2014.

PEIXOTO, R. D. M.; MOTA, R. A.; DA COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 754-762, 2010.

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

PINHEIRO, R.; ALVES, F.; HADDAD, J. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivo Brasileiro Med Veterinaria Zootecnia**, v. 52, n. 10, 2000.

POURBAKHSH, S.A.; ABTIN, A.R.; ASHTARI, A.; BAYATZADEH, M.A.; BARANI, S.M.; ASLI, E. Detection of *Mycoplasma capricolum capricolum* from goats of Qom province, Iran **Archives of Razi Institute**, Vol. 70, No. 1 p.45-50, 2015.

PRATS-VAN DER HAM, M.; TATAY-DUALDE, J.; DE LA FE, C.; PATERNA, A.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; CONTRERAS, A.; GÓMEZ-MARTÍN, Á. Presence of *Mycoplasma agalactiae* in semen of naturally infected asymptomatic rams. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 791–794, 2016.

RAZIN, S., HERRMANN R. **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, 2002.

RAZIN, S. Mycoplasma. In: **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**, Joh Wiley & Sons, 2010.

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. - Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010.

RODRÍGUEZ, J. L.; MONTERAS, A.E.; HERRÁEZ, P.; POVEDA, J.B.; FERNANDEZ, A. Isolation of *Mycoplasma mycoides mycoides* (LC variant), from two naturally aborted caprine fetuses. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 1003-9, Nov 1995.

ROTTEN, S. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. **Physiological Review** 83: 417–432, 2003.

SANTOS, T.C.P.; ALFARO, C.E.P.; FIGUEIREDO, S.M. Aspectos sanitários e de manejo em criações de caprinos e ovinos na Microrregião de Patos, região semiárida da Paraíba. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, p.206-212, 2011.

SANTOS, O. M.; CAMPOS, A. C.; SANTOS, J. P.; SANTOS, P. 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.

SCHIECK, E.; LARTIGUE, C.; FREY, J.; VOZZA, N.; HEGERMANN, J.; MILLER, R.A.; VALGUARNERA, E.; MURIUKI, C.; MEENS, J.; NENE, V.; NAESSENS, J.; WEBER, J.; LOWARY, T.L.; VASHEE, S.; FELDMAN M.F.; JORES, J. Galactofuranose in *Mycoplasma mycoides* is important for membrane integrity and conceals adhesins but does not contribute to serum resistance. **Molecular Microbiology**. v99(1), p.55–70, 2016.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JR. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. Porto Alegre. Ed. Artmed, 2006, 448p.

SHAHRAM, M.; NICHOLAS, R.A.; 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**. 33: 20–24, 2010.

SHAHZAD, W.; MUNIR, R.; RANA, M.Y.; AHMAD, R.; KHAN, M.S.; AKBAR, G.; IJAZ, M.; MEHMOOD, F. Prevalence, molecular diagnosis and treatment of *Mycoplasma conjunctivae* isolated from infectious keratoconjunctivitis affected Lohi

sheep maintained at Livestock Experiment Station, Bahadurnagar, Okara, Pakistan. **Tropical animal health and production**, v. 45, n. 3, p. 737-742, 2013.

SILVA, N.S.; AZEVEDO, E.O. ; CAMPOS, A.C.; CORDEIRO, A.A.; MAMEDE, A.G.; SILVA, R.B.S.; CASTRO, R.S.; ROSENDO NASCIMENTO, E.; MARINHO, M.L. Infecção congênita em cabritos por *Mycoplasma agalactiae* [Congenital infection by *Mycoplasma agalactiae* in goat kids] **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66 n.2, 2014.

SIRAND-PUGNET, P.; LARTIGUE, C.; MAREND, 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 Genetic** 3(5):e75, 2007.

SOUZA, M. L.; CEOLIN, A. L.; ABICHT, A. de M.; Caracterização do estado atual da caprinocultura no Nordeste do Brasil e em Pernambuco. In: **SOBER NORDESTE. 8., 2013. Anais**. Parnaíba: SOBER Nordeste, 2013.

TARDY, F.; MAIGRE, L.; POUMARAT F.; CITTI, C. Identification and distribution of genetic markers in three closely related taxa of the *Mycoplasma mycoides* cluster: refining the relative position and boundaries of the *Mycoplasma sp. bovine* group 7 taxon (*Mycoplasma leachii*) **Microbiology** 155, 3775–3787, 2009.

TARDY, F.; BARANOWSKI, E.; NOUVEL, L-X.; MICK, V.; MANSO-SILVAN, L.; THIAUCOURT, F.; THÉBAULT, P.; BRETON, M.; SIRAND-PUGNET, P.; BLANCHARD, A.; GARNIER, A.; GIBERT, P.; GAME, Y.; POUMARAT, F.; CITTI, C. Emergence of Atypical *Mycoplasma agalactiae* Strains Harboring a New Prophage and Associated with an Alpine Wild Ungulate Mortality Episode. **Applied and Environmental Microbiology** p. 4659–4668, 2012.

TER LAAK, E.; SCHREUDER, B.; SMITH-BUYS, C. The occurrence of *Mycoplasma conjunctivae* in the Netherlands and its association with infectious keratoconjunctivitis in sheep and goats. **Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 2, p. 73-83, ISSN 0165-2176. 1988.

THIAUCOURT, F.; BOLSKE, G. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmas of sheep and goats. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties** v.15, p.1397–1409, 1996.

THIAUCOURT, F.; BOLSKE, G.; LENEGUERSH, B.; SMITH D.; WESONGA H. Diagnosis and control of contagious caprine pleuropneumonia. **Scientific Technical Review**. 15: 1415–1429, 1996.

VAN KUPPEVELD, F. J.; VAN DER LOGT, J.T.; ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J.; QUINT, W.G.; NIESTERS, H.G.; GALAMA, J.M.; MELCHERS, W.J. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2606-15, 1992.

VILEI, E. M.; BONVIN-KLOTZ, L.; ZIMMERMANN, L.; DEGIORGIS, M.P.R.; GIACOMETTI, M.; FREY, J. Validation and diagnostic efficacy of a TaqMan real-time PCR for the detection of *Mycoplasma conjunctivae* in the eyes of infected Caprinae. **Journal of Microbiology Methods**, v. 70, n. 2, p. 384-6, 2007.

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, n. 1, p. 11-15, 2014.

WOUBIT, S.; LORENZON, S. PEYRAUD, A. MANSO-SILVAN, L.; THIACOURT, F. A specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). **Veterinary Microbiology**, v. 104, n. 1-2, p. 125-32, Nov 2004.

YOGEV, D.; BROWNING, G.F.; WISE, K.S. Genetic mechanisms of surface variation. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. editors. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; p. 417–43, 2002.

YU, Z. J.; WANG, T.; SUN, H.; XIA, Z.; ZHANG K.; CHU, D. Contagious caprine pleuropneumonia in endangered Tibetan antelope, China, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 59 p. 189 e 196., 2013.

ANEXOS**ANEXO A – QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL****Micoplasmoses em Caprinos****Ficha de Exame Clínico Individual****Identificação****Data:****Município:****Estado:****Proprietário:****Fazenda/Sítio:****Identificação do animal:****Sexo:****Numero de ordem da pesquisa:****Parâmetros vitais:**

1. Temperatura:
2. Frequência cardíaca (15 seg):
3. Frequência respiratória (15 seg):

Avaliação dos linfonodos:

4. Submandibulares:	☐ normais	☐ edemaciados
5. Pré-escapulares:	☐ normais	☐ edemaciados
6. Inguinais:	☐ normais	☐ edemaciados

Inspeção:

7. Conjuntivas oculares:	☐ normais	☐ hiperêmicas
8. Conjuntivas genitais:	☐ normais	☐ hiperêmicas
9. Articulações:	☐ normais	☐ edemaciadas
10. Glândulas mamárias:	☐ normais	☐ edemaciadas

Auscultação Pulmonar☐

Normal

☐

Creptação

☐

Sibilos

Avaliação das glândulas mamárias:

Tams: Teto Direito:

☐

positivo

☐

negativo

Teto Esquerdo:

☐

positivo

☐

negativo

CMT: Teto Direito:

☐

positivo

☐

negativo

Teto Esquerdo:

☐

positivo

☐

negativo

ANEXO B – QUESTIONÁRIO PROPRIEDADE**Micoplasmoses em Caprinos****Estudo Epidemiológico****Identificação****Data:****Município:****Estado:****Proprietário:****Fazenda/Sítio:****Condições zootécnicas e sinais clínicos observados (para micoplasmoses):**

1. Tipo de exploração: ☐ corte ☐ leite
2. Finalidade da exploração: ☐ comercial ☐ subsistência
3. Tipo de criação: ☐ intensivo ☐ extensivo
4. Tipo de ordenha: ☐ manual ☐ mecânica ☐ não ordenha
5. Realiza-se segregação por faixa etária?: ☐ sim ☐ não
6. Realiza-se IA?: ☐ não ☐ IA e Monta Natural ☐ Só IA
7. Casos de abortamento na propriedade: ☐ sim ☐ não
8. Casos de secreção nasal no rebanho nos últimos 15 dias:
☐ sim ☐ não

Condições de Manejo higiênico-sanitário:

9. Realiza-se limpeza pré-dipping? : ☐ sim ☐ não
10. Realiza-se limpeza pós-dipping? : ☐ sim ☐ não
11. Uso de desinfetantes no ambiente de ordenha? : ☐ sim ☐ não
12. Uso de luvas na ordenha: ☐ sim ☐ não

Termo de Ciência

Eu, _____, proprietário do estabelecimento rural,
_____, estou ciente e autorizo a utilização das
amostras biológicas coletadas dos animais de minha propriedade para fins de
pesquisa científica.

Data: / /

Assinatura