MAYSA SANTOS BARBOSA

Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Versão original

São Paulo
2016

RESUMO

BARBOSA, M. S. **Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de *Mycoplasma agalactiae.*** 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A agalaxia contagiosa (AC) de pequenos ruminantes é uma doença de notificação obrigatória à World Organisation for Animal Health (OIE) que causa severas perdas econômicas para produção de ovinos e caprinos mundialmente. Animais acometidos apresentam alterações clínicas como redução da produção de leite, febre, septicemia, mastite, aborto, e artrite severa, que podem levar à morte. AC é uma síndrome multe etiológica, isto é, três micro-organismos têm sido identificados como causadores da doença: *Mycoplasma agalactiae,* considerado historicamente o principal; *M. capricolum* subsp. *capricolum;* e *M. mycoides* subsp. *capri*. Apesar de seu reconhecido impacto na produção animal, pouco se sabe sobre os fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade do *M. agalactiae*, incluindo seu "core" antigênico. Desta maneira, o presente estudo possuiu como objetivo a identificação, purificação e caracterização de proteínas antigênicas de *M. agalactiae*. Para tanto, sequências de DNA codificantes (CDS) de proteínas de *M. agalactiae* foram analisadas por meio de algoritmos de bioinformática para avaliar a localização celular das proteínas e identificação de epítopos lineares e conformacionais para células B. Foram preditas 156 proteínas localizadas na membrana ou indiretamente ligadas à ela. Após a aplicação dos algoritmos de predição antigênica, quatro proteínas de superfície com potencial antigênico (WP_011949419.1, WP_011949418.1(P40), WP_011949336.1, WP_011949770.1) foram selecionadas para análise posteriores. Essas proteínas foram expressas por plasmídeos específicos em sistema heterólogo de *Escherichia coli* e purificadas por cromatografia de afinidade com níquel imobilizado. Em seguida, as proteínas purificadas foram avaliadas quanto a antigenicidade em *Western blotting* utilizando soros de caprinos naturalmente infectados com *M. agalactiae*. Todas as proteínas expressas foram imunorreativas aos soros de caprinos naturalmente infectados, demonstrando que as proteínas utilizadas nesse estudo são possivelmente antigênicas e possuem epítopos acessíveis. Mais estudos devem ser realizados para avaliar a antigenicidade dessas proteínas contra soro de animais sabidamente negativos para *M. agalactiae*.

Palavras-chaves: *Mycoplasma agalactiae.* Agalaxia contagiosa. Proteína recombinante. Antígenos.

ABSTRACT

BARBOSA, M. S. **Cloning, purification and characterization of recombinant antigenic protein of *Mycoplasma agalactiae*.** [Clonagem, purificação e caracterização de proteínas antigênicas recombinantes obtidas de Mycoplasma agalactiae]. 2016. 100 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The Contagious agalactia (CA) of small ruminants is a notifiable disease to the World Organisation for Animal Health (OIE) and it cause severe economic losses to sheep and goats worldwide. Affected animals show clinical changes such as reduction of milk production, fever, septicemia, mastitis, abortion, and severe arthritis, which can lead to death. AC is a multi etiological syndrome wich three microorganisms have been identified as the cause of the disease*: Mycoplasma agalactiae*, historically considered the principal; *M. capricolum* subsp. *capricolum*; and *M. mycoides* subsp. *capri.* Despite its recognized impact on animal production, little is known about the virulence factors and pathogenic mechanisms of *M. agalactiae*, including its "core" antigen. Thus, the present study has owned the objective of identification, purification and characterization of antigenic proteins of M. agalactiae. For this purpose, DNA coding sequences (CDS) proteins from *M. agalactiae* were analyzed by bioinformatic algorithms to assess the cellular localization of proteins and identification of linear and conformational epitopes for B cells. It were predicted 156 proteins located in the membrane or indirectly linked to it. After application of prediction algorithms antigenic four surface proteins with antigenic potential (WP_011949419.1, WP_011949418.1 (P40), WP_011949336.1, WP_011949770.1) were selected for further analysis. These proteins were expressed in specific plasmids in heterologous system (*Escherichia coli)* and purified by affinity chromatography on immobilized nickel. Then the purified proteins were assayed for antigenicity in Western blotting using goat sera naturally infected with *M. agalactiae*. All expressed proteins were immunoreactive with sera from naturally infected goats, demonstrating that the proteins used in this study are available and have possibly antigenic epitopes. More studies should be conducted to evaluate the antigenicity of these proteins against known negative serum of animals to *M. agalactiae.*

Keywords: *Mycoplasma agalactiae.* Agalactia contagious. Recombinant protein. Antigens.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Caprinocultura

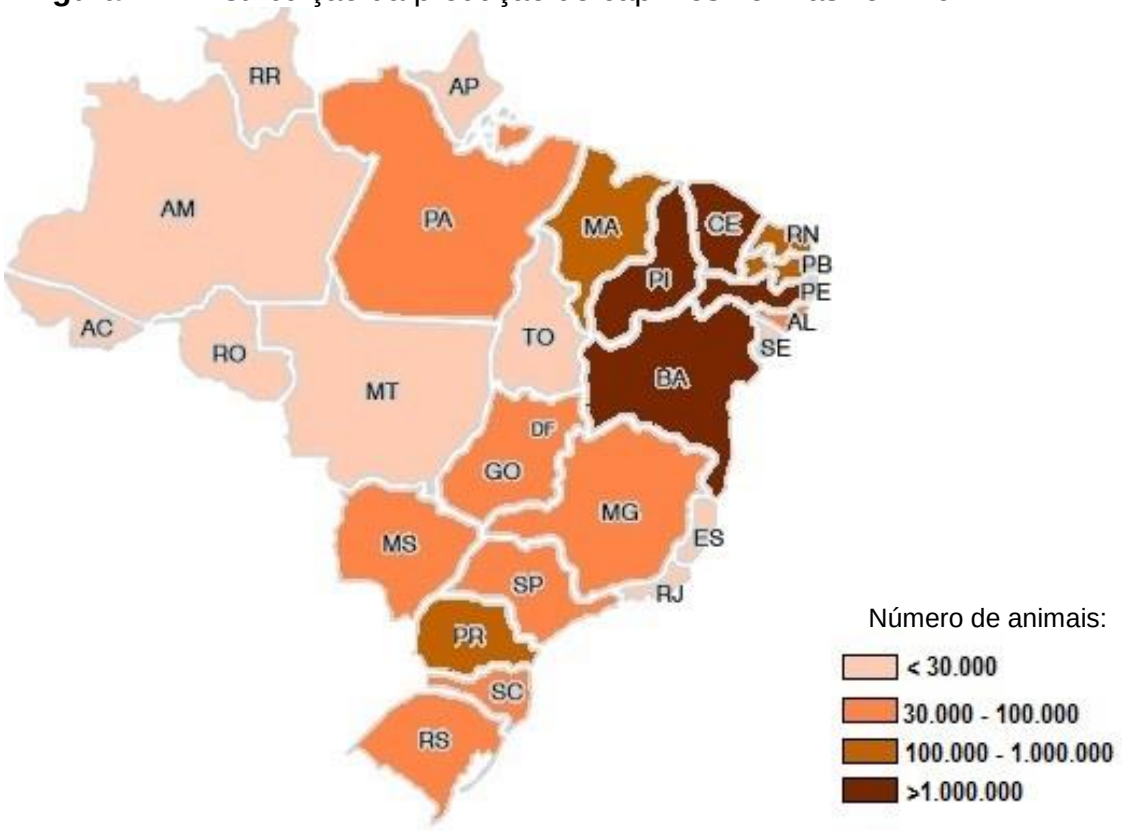
Em 2014, o rebanho mundial de caprinos foi estimado em aproximadamente 1 bilhão de animais, os quais concentram-se nos países em desenvolvimento, principalmente China, Índia e Nigéria. O Brasil possui o maior rebanho caprino das Américas e tem o 22º rebanho mundial com aproximadamente 9 milhões de animais os quais estão distribuídos em 436 mil estabelecimentos pelo país (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2015; WORLD ORGAZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE), 2014). Nos últimos anos, a caprinocultura tem se destacado no agronegócio brasileiro por ser uma atividade econômica em expansão. Há novos arranjos produtivos em regiões tradicionais e crescimento da atividade comercial em regiões com menor produção. O Nordeste brasileiro destaca-se por possuir mais de 90% de todo rebanho nacional, principalmente na Bahia, Pernambuco, Piauí e Ceará. Seguido pela região Sul, a segunda região em relevância de rebanho, mas que possui apenas 4% do total (figura 1) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2014; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), 2016).

O rebanho de caprinos do Brasil é constituído principalmente por animais denominados SRD – Sem Raça Definida, os quais são cruzamentos da raça nativa conhecida como Crioulo com raças importadas. A raça Crioulo é descendente direta dos caprinos ibéricos trazidos ao Brasil pelos portugueses no período de colonização. As raças exóticas de cabras leiteiras exploradas na região Nordeste são, basicamente, as seguintes: Saanen, Parda Alpina, Toggemburg e Anglo-Nubiana. Dentre as raças puras exóticas que se adaptaram às condições do clima nordestino, destacam-se na produção leiteira a raça: Canindé; na produção de carne e pele: Bôer, Moxotó e Repartida; e na produção dos três produtos: Marota e Graúna (FILHO; JUNIOR; YAMAMOTO, 2010; MCMANUS; PAIVA; LOUVANDINI, 2010; MADRUGA et al., 1999).

A importância econômico-social dos caprinos criados no Brasil reside na produção de leite, carne e pele. A produção de leite de cabra é de aproximadamente 21 milhões de litros anualmente (1,7% da produção de leite de cabras mundial) e

envolve, em grande parte, empresas de pequeno porte. Geralmente, essa produção é utilizada para a subsistência das famílias, não tendo uma destacada indústria ou um importante comércio de laticínios de cabra. Sabe-se que mesmo com o tamanho do rebanho no Nordeste, há pouco aproveitamento de seu potencial de produção de leite de cabra e derivados. Da mesma forma, apesar da carne caprina ser uma das mais magras, seu consumo ainda é baixo nacionalmente, estimado em menos de 1,0 Kg per capita/ano. A maioria dessa carne comercializada para consumo tem origem no abate clandestino (menos de 5% da carne comercializada possui inspeção federal ou estadual, no Nordeste), enquanto uma pequena parcela se destina ao consumo de subsistência. A produção de pele de caprinos, por sua vez, consiste apenas em uma atividade complementar. A caprinocultura, porém, vem dando sinais de crescimento econômico, principalmente devido à implantação de agroindústrias, frigoríficos e abatedouros para pequenos ruminantes em todo Brasil, sobretudo nas grandes cidades (CORDEIRO; CORDEIRO, 2009; FIGUEIREDO-JUNIOR et al., 2009; FILHO; JUNIOR; YAMAMOTO, 2010; MAPA, 2016; MONTEIRO, 2014; SILVA; ARAUJO, 2000).

Figura 1 - Distribuição da produção de caprinos no Brasil em 2014



Fonte: BARBOSA, 2016. Baseado no banco de dados do IBGE (IBGE, 2014).

1.2 Características gerais dos *Mollicutes*

Os micro-organismos da Classe *Mollicutes* não possuem parede celular, ao contrário das bactérias típicas, e são considerados os menores organismos de vida livre. São, portanto, resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos e sobrevivem à lise osmótica em ambientes isotônicos. Seus pequenos tamanhos coincidem com genomas reduzidos ou mínimos, entre 580 e 2.200 Kbp e com baixo conteúdo de G+C (24-33%), sob uma via de redução metabólica, o que torna esses micro-organismos nutricionalmente exigentes. Esses micro-organismos também se apresentam filogeneticamente relacionados às bactérias gram-positivas, tendo evoluído de bactérias gram-positivas ancestrais de forma degenerativa (redutiva) (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

A classe *Mollicutes* é composta por quatro ordens: *Mycoplasmatales, Entomoplasmatales, Acholeplasmatales* e *Anaeroplasmatales.* A ordem *Mycoplasmatales* é composta por duas famílias: *Mycoplasmataceae* e *Incertae sedis.* Por sua vez, a família *Mycoplasmatacaeae* é composta pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma,* os quais possuem mais de 200 espécies identificadas (BERGEY, 2010; RAZIN et al., 1998). Nesse texto, o termo molicutes será designado como nome trivial para todos os membros dessa classe, e o termo micoplasma é referente ao nome trivial para todas as espécies do gênero *Mycoplasma,* como indicado por Bergey (2010). Micoplasmas são células pleomórficas com 300 - 800 nm de diâmetro. Quase todas as espécies crescem dentro do meio sólido, com 0,9% de ágar, formando colônias refringentes com a aparência de “ovo frito” se observadas em estereomicroscópio. A maioria das espécies requerem esteróis e ácidos graxos do meio de cultura para o crescimento. Ao contrário das bactérias típicas, não turvam os meios de cultura líquidos. Todas as espécies possuem a via respiratória do ciclo do ácido tricarboxílico incompleto, reduzindo sua capacidade de fosforilação oxidativa. Algumas espécies catabolizam a glicose para produzir ATP e, consequentemente, diminuem o pH do meio. Outras espécies não fermentativas hidrolisam a arginina e aumentam o pH do meio. Algumas outras espécies podem possuir ambas as vias, como *Mycoplasma fermentans*, e outras, nenhuma das vias, como *M. bovis*, sendo capazes de metabolizar piruvato ou lactato para a produção de ATP (BEAMAN; POLLACK, 1983; BERGEY, 2010).

Micoplasmas possuem certa especificidade aos hospedeiros e tecidos, provavelmente devido à sua exigência nutricional. Estas bactérias, em geral, preferem colonizar superfícies mucosas do trato respiratório e urogenital, olhos, glândulas mamárias e articulações (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). São capazes de infectar mamíferos, aves, répteis e peixes, podendo ser comensais ou atuar como agentes primários ou oportunistas variando os quadros e sinais clínicos. Conhecidos pela maior capacidade de estabelecer infecções crônicas do que as agudas, são de difícil controle e podem causar perdas econômicas importantes em animais de produção (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994)

Aproximadamente 40 micoplasmas podem colonizar ruminantes domésticos (bovinos, ovinos e caprinos), sendo alguns patogênicos e outros oportunistas (CHAZEL et al., 2010). *M. mycoides* subsp *mycoides* “Small Colony” (MmmSC) e *M. bovis* são os principais patógenos bovinos. Em pequenos ruminantes, dentre os principais micoplasmas patogênicos, destacam-se *M. mycoides* subsp. *capri, M. capricolum* subsp. *capricolum, M. capricolum* subsp. *capripneumoniae,* e *M. agalactiae*. Destes, três espécies provocam micoplasmoses de notificação obrigatória pela *World Organisation for Animal Health* (OIE) por possuírem importante impacto econômico: a Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (PPCB), causada pelo *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC; a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) causada pelo *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*; e a Agalaxia Contagiosa (AC) causada por várias espécies de micoplasmas: *M. agalactiae, M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. mycoides* subsp. *capri* (AYLING et al., 2004; DAMASSA et al., 1992; LORIA et al., 2003; NICHOLAS, 2002; NICHOLAS et al., 2008). Em geral, as micoplasmoses mais importantes em pequenos ruminantes possuem alta morbidade e mortalidade (ALVES et al., 2013; DAMASSA; WAKENELL; BROOKS, 1992; DE AZEVEDO et al., 2006; KINDE et al., 1994).

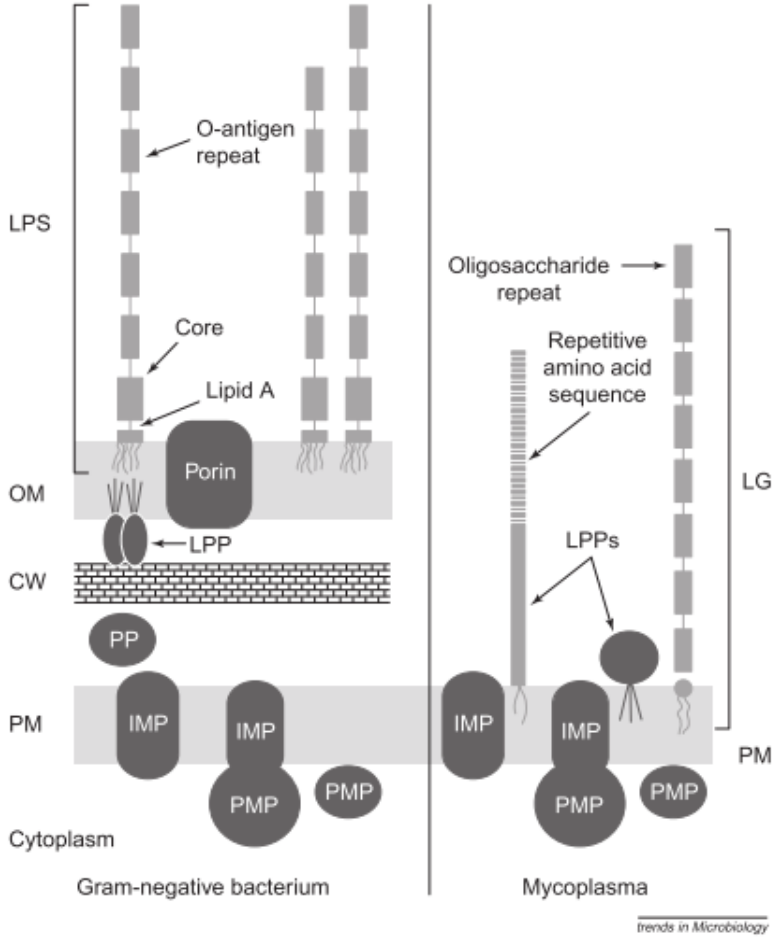
1.3 Moléculas imunodominantes e fatores de virulência em micoplasmas

1.3.1 Lipoproteínas (LPP)

Micoplasmas possuem várias proteínas de membrana associadas a lipídeos (lipoproteínas) (LPPs). Essas LPPs de membrana são importantes antígenos dos molicutes e estão ancoradas na membrana citoplasmática, enquanto nas bactérias

gram-negativas estão ancoradas na membrana externa (figura 02). Ao contrário de bactérias com parede celular, que apresentam um menor número dessas moléculas, dois terços da massa da membrana dos micoplasmas correspondem às LPPs (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; YOU; ZENG; WU, 2006).

Figura 2 - Lipoproteínas em micoplasmas

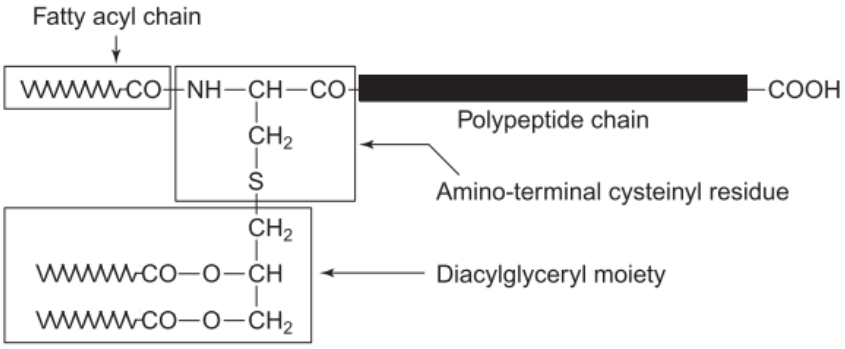


Legenda: Figura esquemática comparativa da localização celular de lipoproteínas no envoltórios de bactérias Gram-negativas e em micoplasmas. Micoplasmas não possuem parede celular e membrana externa. Nesses micro-organismos as lipoproteínas estão ancoradas no folheto externo da membrana plasmática. CW: parede celular; IMP: proteínas integrais de membrana; LG: lipoglicano; LPP: lipoproteína; LPS, lipopolissacarídeo; OM: membrana externa; PM: membrana plasmática; PMP: proteína periférica de membrana; PP: proteína periplasmática.
Fonte: CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999.

Estruturalmente, as lipoproteínas possuem dois ácidos graxos ligados a um resíduo animo-terminal de cistenil N-acilado ou não da cadeia de polipeptídeo (figura 3). Como nas bactérias gram-positivas e gram-negativas, LPPs de micoplasmas

podem ser triaciladas, entretanto, a ocorrência de lipoproteínas diaciladas é maior. Também tem sido evidenciado a ausência de acilação, provavelmente resultante da perda ou mutação do gene codificador da N-acetiltransferase. A presença de lipoproteínas diaciladas e triaciladas pode ocorrer em uma mesma espécie. A diferença nos padrões de acilação consiste em importante implicação para a interação desses micro-organismos e o ambiente, uma vez que lipoproteínas diaciladas podem estimular mais algumas respostas imunes do que proteínas triaciladas, uma vez que pode afetar o reconhecimento de diferentes *Toll-like receptors* (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999; YOU; ZENG; WU, 2006).

Figura 3 - Estrutura química de lipoproteínas bacterianas



Legenda: Estrutura química do aminoácido terminal de lipoproteínas bacterianas ancoradas na membrana. A lipoilação do resíduo amino terminal cistenil é uma característica de todas lipoprotroteínas de membrana bacteriana conhecidas. O grupo amino do resíduo cistenil é bloqueado em algumas lipoproteínas por uma terceira cadeia de ácido graxo.
Fonte: CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999.

Os molicutes possuem apenas a presença da peptidase sinal II (SPase II), ao contrário da maioria das bactérias, as quais possuem dois tipos de peptidase sinal (I e II) (RAZIN; HERRMANN, 2002). SPase II são proteases ligadas à membrana as quais clivam proteínas após a translocação do interior para o exterior da célula (PAETZEL et al., 2002). A SPase II cliva a forma precursora, prolipoproteína, no resíduo de cisteína o qual torna-se o primeiro aminoácido da proteína processada (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Algumas LPPs importantes em *Mycoplasmas* spp. têm sido descritas, tais como: a LppQ em *M. mycoides subsp. mycoides SC* (ABDO; NICOLET; FREY, 2000); P60 em *M. capricolum* subs. *capricolum* (ALBERTI et al., 2008) e P30 em *M.*

pneumoniae (VARSHNEY et al., 2008), dentre outras. Essas moléculas expostas à superfície bacteriana podem possuir as mesmas funções que proteínas periplasmáticas em gram-negativos. Várias LPPs de micoplasmas são importantes fatores de virulência e alvos de anticorpos inibidores de crescimento podendo apresentar diversas funções como, por exemplo apoptose (BAI et al., 2015), variação antigênica (CITTI; NOUVEL; BARANOWSKI, 2010; FERRIS et al., 1999), transporte (SCHMIDT; BROWNING; MARKHAM, 2007), atividade de nuclease (CACCIOTTO et al., 2013) e adesão (BELLOY et al., 2003; IVERSON-CABRAL; WOOD; TOTTEN, 2015).

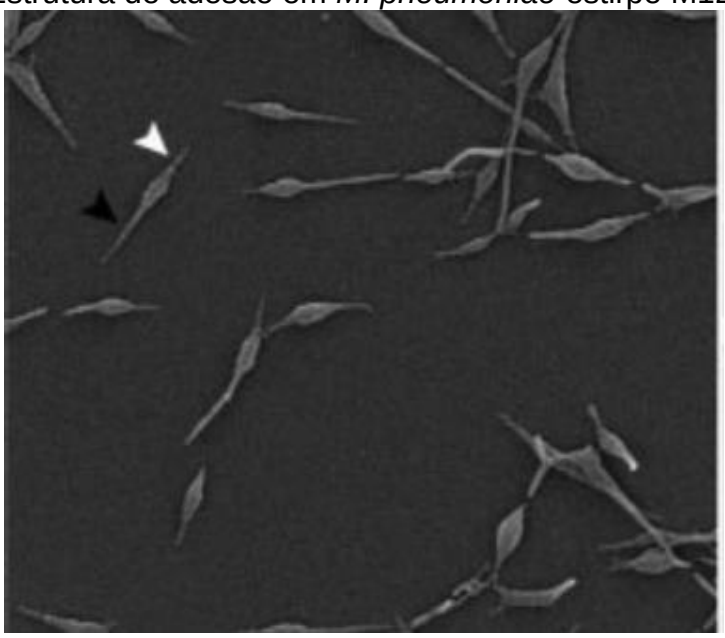
1.3.2 Citoaderência

Apesar de possuírem simplicidade funcional e estrutural quando comparado com outras bactérias, micoplasmas são mais complexos do que se espera de um micro-organismo com genoma reduzido. De fato, as interações entre estes micro-organismos e o hospedeiro são resultado de algumas propriedades da membrana citoplasmática (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999). Desta forma, a ausência da parede celular nos *Mollicutes* também propicia a aderência bacteriana pelas adesinas de membrana com os receptores específicos das células hospedeiras. Esta aderência, em algumas espécies, permite a fusão da membrana bacteriana com a célula hospedeira, levando a transferência ou troca de componentes e acúmulo de produtos do metabolismo que podem causar danos oxidativos (RAZIN; JACOBS, 1992).

Em alguns micoplasmas a citoaderência é um dos principais fatores de virulência e diversas moléculas têm sido descritas como adesinas, dentre elas, algumas lipoproteínas como VlhA (lipoproteína variável de adesão à hemaglutinina A) em *M. synoviae* (BENCINA, 2002; KHIARI; MARDASSI, 2012), Vaa (adesina variável associada à aderência) em *M. hominis* (BOESEN et al., 2001) e Vlp (lipoproteína variável) em *M. hyorhinis* (XIONG et al., 2016). Outros micoplasmas, como *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae,* possuem uma extensão celular polar, denominada de “organela de adesão” (figura 4), a qual auxilia a adesão e motilidade por deslizamento (OPITZ; JACOBS, 1992; ROTTEM; NAOT, 1998; ROTTEM, 2003; WAITES; TALKINGTON, 2004). Essa estrutura é composta por adesinas e proteínas acessórias de aderência que interagem para fornecer características estruturais e

funcionais (ROTTEM, 2003). *M. conjuntivae,* apesar de não possuir esta “organela”, também adere às células do hospedeiro por adesinas de superfície (BELLOY et al., 2003). Estudos anteriores mencionam que a ausência dessas proteínas não permite a citoaderência na célula hospedeira bem como a colonização no hospedeiro, além de serem imunogênicas (ROMERO-ARROYO et al., 1999; SVENSTRUP et al., 2002).

Figura 4 - Estrutura de adesão em *M. pneumoniae* estirpe M129



Legenda: Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a morfologia da estirpe selvagem de *M. pneumoniae* M129 contendo as proteínas P30 e P32. Seta branca indica a estrutura de adesão e seta preta indica um filamento que auxilia na movimentação. Barra: 1 mm.
Fonte: RELICH; BALISH, 2011, com adaptações.

A adesão ou proximidade de micoplasmas é necessária para produzir danos às células hospedeiras. *M. hyopneumoniae,* após contato com células epiteliais ciliadas *in vitro,* foi capaz de induzir citotoxidade e diminuição da atividade ciliar e a perda de cílios (DEBEY; ROSS, 1994). De forma semelhante, *M. penetrans,* pela sua atividade de fosfolipase A1, causou danos na membrana de célula hospedeira (SALMAN; ROTTEM, 1995). As atividades citotóxicas por fosfolipases têm sido caracterizadas também em outros micoplasmas (KORNSPAN; ROTTEM, 2012; SHIBATA; SASAKI; WATANABE, 1995).

1.3.2 Invasão

A invasão bacteriana de células eucarióticas envolve um complexo processo que se inicia com a adesão (CHAUSSEE; COLE; VAN PUTTEN, 2000). A invasão de micoplasmas em células era pouco conhecida. Alguns micoplasmas possuem a capacidade de internalizar células não fagocíticas, como *M. bovis* (BÜRKI et al., 2015; VAN DER MERWE; PRYSLIAK; PEREZ-CASAL, 2010), *M. agalactiae* (HEGDE et al., 2015), *M. synoviae* (DUŠANIĆ et al., 2009) e *M. suis* (GROEBEL et al., 2009). Dessa forma ocorre a proteção bacteriana da resposta imune do hospedeiro, da ação de antibióticos (ROTTEM, 2003) e posterior disseminação do micro-organismo no hospedeiro (BÜRKI; FREY; PILO, 2015). Invasão e localização perinuclear de alguns molicutes também têm sido descritas (MARQUES et al., 2010; UENO et al., 2008; WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000). *M. gallisepticum* de baixa passagem foi capaz de aderir e invadir células HeLa e fibroblastos de embriões de galinha, no entanto a estirpe de alta passagem apenas aderiu às células (WINNER; ROSENGARTEN; CITTI, 2000).

1.3.3. Superantígenos

Superantígenos são potentes proteínas imunoregulatórias capazes de ativar linfócitos T de forma inespecífica, induzindo-os a secretar altos níveis de citocinas. Superantígenos possuem a característica de serem apresentados diretamente às e reconhecidos pelas células T sem o processamento por células apresentadoras de antígenos. Como o reconhecimento é dependente de poucos elementos, várias células T podem ser ativadas (ROTTEM, 2003; SHIO et al., 2014).

O superantígeno de *M. arthritidis,* denominado MAM, é o mais estudado em *Mollicutes.* Este micro-organismo causa poliartrite severa em roedores e já foi descrito infectando humanos (ATAEE et al., 2015). O MAM é capaz de estimular linfócitos murinos e humanos. Em camundongos, MAM, pode modular o sistema imune semelhantemente ao ocorrido em doenças autoimunes como a artrite reumatoide em humanos (COLE; ATKIN, 1991). Baseado na sequência linear e predição da estrutura secundária dessa molécula observou-se que esta não é filogeneticamente ou estruturalmente relacionada a outros superantígenos.

Entretanto, há evidências de pequenas regiões homólogas à domínios funcionais em superantígenos comuns (COLE et al., 1996).

1.3.4 Antígenos Variáveis de Superfície

A variação antigênica consiste na habilidade de uma espécie microbiana em alterar características antigênicas dos componentes de sua superfície incluindo flagelo, pili, proteínas de membrana e cápsula. Dessa forma, aumenta a possibilidade de colonização ao tecido hospedeiro e evasão do sistema imune facilitando o estabelecimento da infecção crônica (BROWNING et al., 2011; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Apesar da redução gênica dos micoplasmas, o número de genes envolvidos na diversificação de sua superfície celular é inesperadamente alta (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). A utilização de múltiplos genes variáveis organizados em famílias permite a geração de extensivo repertório de variação antigênica (ROTTEM, 2003). O mecanismo de diversidade antigênica através da variação de fase ou tamanho/sequência é caracterizado por ser reversível e por possuir alta frequência de eventos mutacionais que regularão a expressão e/ou a estrutura (variação de tamanho e/ou sequência) de cada membro de uma família multigênica (GLEW et al., 2000). Dessa forma, várias espécies de micoplasmas são capazes de modificar seus antígenos de superfície com alta frequência e assim, promover a diversidade gênica maximizando o potencial de um genoma limitado (BASEMAN; TULLY, 1997).

M. hyorhinis foi o primeiro micoplasma com relato de uma família gênica codificando lipoproteínas variáveis (Vlps). A família Vlp é composta por sete membros: VlpA, VlpB, VlpC, VlpD, VlpE, VlpF e VlpG. O sistema Vpl provém uma estratégia mutacional para gerar diversidade nas proteínas de superfície de *M. hyorhinis* permitindo evadir-se do sistema imune por meio da modulação de sua capacidade de aderência (CITTI et al., 2000; RAZIN; HERRMANN, 2002; XIONG et al., 2016). Entre as proteínas de variação de fase melhor estudadas em micoplasmas, destacam-se a lipoproteína VlhA, uma hemaglutinina, em *M. synoviae.* Após modificações pós traducionais, VlhA é clivada em MSPA e MSPB; dessas, apenas a porção C-terminal de MSPA está envolvida na hemadsorção e hemaglutinação (KHIARI; MARDASSI, 2012). De maneira semelhante, *M. bovis* possui altos níveis de variação dinâmica de antígenos, os quais pertencem à família

de variação de fase de lipoproteínas de superfície (Vsp). Na estirpe PG45, essa família é composta por 13 diferentes genes *vsp* de cópias únicas, organizados no locus-vsp. A co-expressão desses diferentes Vsps levam à características estruturais e antigênicas específicas (BÜRKI et al., 2015).

1.4 *Mycoplasma agalactiae* e a Agalaxia contagiosa

1.4.1 História e Impacto econômico

Agalaxia contagiosa (AC) tem sido relatada desde o século XIX. Em 1816, na Itália, a doença clínica foi descrita pela primeira vez, mas apenas em 1871 denominou-se de Agalaxia contagiosa. Em 1923, *M. agalactiae,* um dos principais agentes causadores da AC, foi cultivado e isolado pela primeira vez por J. Bridre e A. Donatien. Em 1931, foi inicialmente denominado *Anulomyces agalaxie* por Wroblewski. Em 1957, após mudanças na taxonomia de micoplasmas chamou-se o agente de *M. agalactiae*. Em estudos posteriores, outros micoplasmas foram também associados à doença, estabelecendo a agalaxia contagiosa de pequenos ruminantes como uma enfermidade de natureza multe etiológica (KUMAR et al., 2014; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001).

Rebanhos afetados com AC podem apresentar altas taxas de mortalidade e morbidade. A prevalência de animais com sinais clínicos em um rebanho pode ser de 30% a 60% e em animais jovens a mortalidade pode ser de 40-70%. Esses fatores associados à redução ou ausência da produção de leite, abortos, custos com diagnóstico, tratamento e prevenção podem causar perdas econômicas significativas. As perdas estimadas atingem cerca 30 milhões de dólares por ano em países europeus, principalmente em países com produção intensiva de ovelhas e cabras, tornando-se um importante problema de saúde animal (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001; NICHOLAS, 2002).

1.4.2 Etiologia

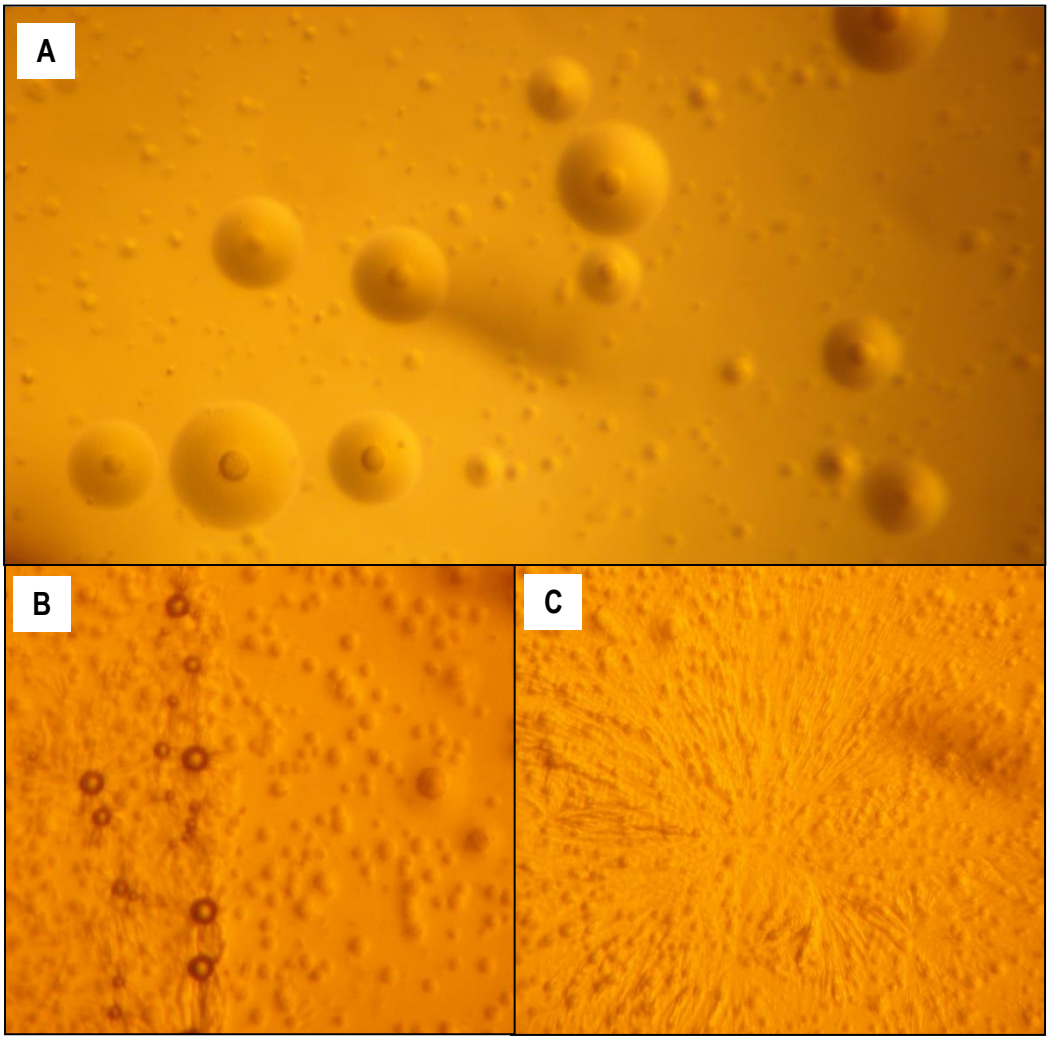
A AC é uma síndrome infecciosa multe etiológica em pequenos ruminantes, causada principalmente por *M. agalactiae,* responsável por mais de 80% das infecções (ADDIS et al., 2011; LORIA; NICHOLAS, 2013). Outros dois micoplasmas

podem causar AC mais frequentemente em cabras do que ovelhas: *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. mycoides* subsp. *capri* (ASSUNÇÃO et al., 2006b; BARANOWSKI et al., 2010; BECKER et al., 2012; CHAZEL et al., 2010; NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008). Alguns autores também correlacionam as infecções causadas pelo *M. putrefaciens* à AC (CHAZEL et al., 2010; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013), enquanto outros associam essas infecções à uma doença com manifestações clínicas e patológicas similares (KUMAR et al., 2014; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Além disso, co-infecções de diferentes espécies de micoplasmas também podem ocorrer (AMORES et al., 2011; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013).

1.4.2.1 *Mycoplasma agalactiae*

M. agalactiae é imóvel e possui entre 124-250 nm de diâmetro. Cresce em pH ótimo de 7,6 à 37 ºC em meio enriquecido com soro animal que fornece o esterol, composto essencial para a síntese da membrana plasmática. Em meio sólido produz colônias de aparência típica de “ovo frito” (figura 5), e forma "películas e manchas" devido a reação ao soro de equino inativado por calor. Essa película é composta de colesterol e fosfolipídios e as manchas contem sais de ácidos graxos os quais aparecem em torno das colônias. Este micoplasma cresce tanto em meio SP4 quanto em Hayflick suplementado com glicose. Apesar de não fermentar glicose nem hidrolisar ureia ou arginina, é sensível às alterações de pH (BERGEY, 2010; KUMAR et al., 2014). Além disso, este micro-organismo possui oito diferentes sorotipos (A - H) indicando alta variabilidade antigênica parcialmente relacionada com a origem geográfica dos isolados (BERGONIER et al., 1996). *M. agalactiae* é sensível à luz solar, radiação ultravioleta e inativado a 60 ºC por cinco minutos e 100 ºC por um minuto. É destruído por desinfetantes com princípio ativo, como: hidroclorido de potássio, formalina e cloroaminas (KUMAR et al., 2014).

Figura 5 - Crescimento de *M. agalactiae* em meio SP4



Legenda: Colônias de *M. agalactiae* em meio SP4 visualizadas em estereomicroscópico. A: Colônias típicas em forma de "ovo frito". B e C: Manchas e filmes, respectivamente, formados devido a uma reação do micro-organismo e o soro equino no meio de cultura (BARBOSA, 2016).

M. agalactiae possui padrões proteicos eletroforéticos similares ao *M. mycoides* subsp. *capri* e *M. bovis* (RAZIN, 1968). *M. agalactiae* e *M. bovis* possuem características morfológicas e vias metabólicas bastante similares, compartilhando vários antígenos. Diante disso, diferenciá-los através de métodos morfológicos, metabólicos e sorológicos torna-se limitado (KUMAR et al., 2014). Devido à similaridade entre os dois micro-organismos, inicialmente foi sugerido que o *M. agalactiae* e o *M. bovis* fossem uma única espécie (RAZIN, 1968). O sequenciamento da sequência 16S rRNA de *M. agalactiae* e *M. bovis* demonstrou que apesar dessas espécies possuírem uma similaridade de mais de 99,8 % nessa sequência elas não são a mesma espécie, mas são distinguíveis por testes de inibição de crescimento e imunofluorescência. Além disso, hidridização DNA-DNA

tem revelado somente 40% de homologia entre *M. bovis* e *M. agalactiae* (PETTERSSON; UHLEN; JOHANSSON, 1996; RAZIN; HERRMANN, 2002).

Análises genéticas demonstraram que *M. agalactiae* pertence ao grupo filogenético hominis, assim como *M. bovis,* enquanto os outros membros que compreendem o "*cluster* mycoides" pertencem ao grupo filogenético spiroplasma. Além disso, o sequenciamento do genoma do *M. agalactiae* demonstrou que este possui um genoma pequeno de aproximadamente 880 Kpb. Ao ser comparado com outros molicutes, *M. agalactiae* possui 18% dos genes transferidos horizontalmente ou adquiridos de micoplasmas do "*cluster* mycoides" que são filogeneticamente distantes apesar de compartilhar o mesmo hospedeiro. Este foi o primeiro relato de transferência de genes em larga escala entre micoplasmas. Assim como outros micoplasmas, esse micro-organismo também possui um baixo conteúdo %GC (29,7%) e usa preferencialmente o códon UGA ao invés do UGG, como códon codificador de triptofano (SIRAND-PUGNET et al., 2007)

Acreditava-se que este micro-organismo fosse incapaz de penetrar nas células, apesar da sua capacidade de aderir ao epitélio colonizado (ADDIS et al., 2011). Entretanto, recentemente tem-se demonstrado a capacidade deste micoplasma em invadir *in vitro* diferentes células de ruminantes, dentre elas, células endometriais bovinas e fibroblastos de pulmão de búfalo (HEGDE et al., 2014) além de células primárias de ovelhas (células mamárias epiteliais e estromais; e células uterinas epiteliais e estromais). Porém, os mecanismos envolvidos na invasão do *M. agalactiae* ainda não foram elucidados (HEGDE et al., 2015).

M. agalactiae possui uma família de lipoproteínas codificada pelos genes *vpma,* os quais estão relacionados à variação de fase na expressão dessas proteínas pelo mecanismo *cut-and-paste* auxiliado por uma recombinase específica, Xer1, localizada próxima ao locus gênico *vpma*. Até o momento, tem-se descrito que a estirpe PG2 possui um único cluster de seis genes *vpma* e um único promotor, expressando assim um gene *vpma* por célula e um total de seis combinações gênicas. Ao contrário, a estirpe 5632 pode expressar duas Vpmas e no mínimo 91 combinações de Vpma, pois possui 23 genes *vpma* distribuídos em dois *clusters* separados, contendo um gene *xer1,* cada (CITTI; NOUVEL; BARANOWSKI, 2010; GLEW et al., 2000, 2002; NOUVEL et al., 2009). Tem-se descrito que a variação de fase relacionada à moléculas Vpma não são necessárias para o estabelecimento da infecção, mas pode influenciar na sobrevivência e persistência do patógeno,

principalmente por aumentar a capacidade de disseminação e evasão do sistema imune do hospedeiro (CHOPRA-DEWASTHALY et al., 2012).

1.4.3 Epidemiologia

A agalaxia contagiosa, assim como a pleuropneumonia contagiosa bovina e pleuropneumonia contagiosa caprina, são classificadas pela World Organisation for Animal Health (OIE) como doenças de notificação obrigatória, pelo impacto econômico significativo na pecuária (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012; ASSUNÇÃO et al., 2007; BECKER et al., 2012). Essa doença afeta pequenos ruminantes, de ambos os sexos, no mundo e possui impacto bastante descrito na caprinocultura da maioria dos países do Mar Mediterrâneo. Entretanto, *M. agalactiae* tem sido também relatado e isolado em outros países, como Índia, Austrália, Turquia, Irã, Jordânia, Mongólia, Nigéria, Senegal, Iraque, Bulgária, Sérvia, Sudão, Rússia, Estados Unidos e Brasil (AL-MOMANI; NICHOLAS; ABO-SHEHADA, 2008; ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012; CHAZEL et al., 2010; DE LA FE et al., 2005; KUMAR et al., 2014; LORIA et al., 2003).

Devido ao fato de ser considerada endêmica na região, diversos estudos sobre a AC têm sido realizados nos países banhados pelo mar mediterrâneo (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012). Na Espanha, foi relatada presença deste micro-organismo em *swab* auricular, sêmen e leite ao avaliar caprinos em centros de inseminação artificial, indicando a presença do micro-organismo em animais assintomáticos de programas de reprodução (AMORES et al., 2011). Mais recentemente, foi descrito também na Espanha, a alta prevalência de *M. agalactiae* em sêmens de carneiros assintomáticos naturalmente infectados (26,35%) (PRATS-VAN DER HAM et al., 2016) e em leite de ovelhas (36,8%) (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO; HERNÁNDEZ, 2012). Resultados semelhantes também foram observados em outros estudos no mesmo país (DE LA FE et al., 2005, 2010). Na Espanha, após caracterização genômica por PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), VNTR (*multilocus variable number tandem-repeat*), e MLST (*multilocus sequence typing*) de *M. agalactiae* isolados de ovinos, foi demonstrado alta homogeneidade genômica dos isolados com a circulação de uma única população clonal endêmica (ARIZA-MIGUEL; RODRÍGUEZ-LÁZARO;

HERNÁNDEZ, 2013). Resultado contrário foi observado um ano antes, no mesmo país, destacando-se alta diversidade genética dessa bactéria usando metodologia similar em isolados de caprinos sugerindo que estirpes diferentes colonizam hospedeiros diferentes nessa região (DE LA FE et al., 2012). Na França, a AC também é amplamente distribuída, mas ao contrário dos outros países mencionados, o principal patógeno infectando caprinos foi *M. mycoides* subs *capri* e não *M. agalactiae*. Entretanto, em ovelhas, *M. agalactiae* permanece endêmico (CHAZEL et al., 2010).

No Brasil, existem poucos estudos sobre a distribuição e prevalência de micoplasmas em pequenos ruminantes. Em 1942 ocorreu o primeiro relato de AC no Brasil, no estado de São Paulo, entretanto micoplasmas não foram isolados (PENHA; D'APICE, 1942). Posteriormente, em 2004, houve a primeira descrição da detecção de *Mycoplasma spp.* em ovinos causando artrite, também em São Paulo, mas não foi possível a elucidação da espécie (GREGORY et al., 2004). Foi apenas em 2006 que se relatou pela primeira vez a ocorrência de Agalaxia contagiosa em rebanhos caprinos nacionais, provocada por *M. agalactiae*, no estado da Paraíba. O micro-organismo foi isolado do leite, exsudato das articulações, *swab* nasal e lavagem auricular. Foi descrito alta morbidade e mortalidade de até 100% (DE AZEVEDO et al., 2006). Posteriormente, Bandeira et al (2008), evidenciaram a presença desse micro-organismo também na Paraíba em 20% dos rebanhos de caprinos detectados por PCR em amostras de leite. Em Pernambuco, Alves et al., (2013) detectaram DNA de *M. agalactiae* em amostras de sêmen (17,9%), leite (3,7%) de caprinos naturalmente infectados e em amostras de sêmen congelados de centros de inseminação artificial (26,9%). Não foi evidenciado nenhum sinal clínico associado à AC nos animais, assim como, não havia alteração nas análises de qualidade, atividade e motilidade do sêmen, indicando um possível processo crônico ou doença subclínica (ALVES et al., 2013). Relatos de infecção congênita por *M. agalactiae* também têm sido notificados no país. Observa-se que as crias nascem com sinais clínicos de agalaxia contagiosa e são imunotolerantes (SILVA et al., 2014).

A frequência de *M. agalactiae* em animais selvagens também tem sido descritas, como em *Capra ibex* (CHAZEL et al., 2010) e *Capra pyrenaica,* na Espanha (GONZÁLEZ-CANDELA et al., 2006; VERBISCK et al., 2010; VERBISCK-BUCKER et al., 2008)**.** Essas infecções representam risco para a densidade

populacional, uma vez que, esses animais infectados constituem como reservatórios para micoplasmas patogênicos (KUMAR et al., 2014).

1.4.4 Transmissão da doença

M. agalactiae é estável à temperatura ambiente, característica que favorece a rápida disseminação por meio do contato entre animais infectados e animais suscetíveis. Além disso, animais jovens sem anticorpos maternos, fracos, debilitados, desnutridos, imunocomprometidos, animais sobre estresse de transporte e estresse fisiológico como prenhez e expostos a condições climáticas extremas são mais susceptíveis à infecções. O contato com secreções auriculares, oculares, nasais, fezes, leite, urina e excreções de lesões articulares constituem as principais fontes de transmissão do micro-organismo (KUMAR et al., 2014). Transmissão sexual pelo sêmen infectado também pode ocorrer (ALVES et al., 2013; AMORES et al., 2011) e utensílios contaminados na ordenha também são fontes de infecção (KUMAR et al., 2014). A transmissão vertical através de colostro e leite contaminados também tem sido descritos (PATERNA et al., 2013).

Excreção do *M. agalactiae* no leite após oito anos da infecção em animais sem sinais clínicos ou com sinais clínicos leves também podem ocorrer. Dessa forma, a presença de animais portadores assintomáticos no rebanho constituem importante fonte de infecção. O gado, camelos e outros animais selvagens infectados também podem servir de reservatórios (CHAZEL et al., 2010; GONZÁLEZ-CANDELA et al., 2006; KUMAR et al., 2014; VERBISCK et al., 2010; VERBISCK-BUCKER et al., 2008).

Evitar a aquisição de animais infectados, realizar higienização adequada dos utensílios de ordenha e do ordenhador, separar animais jovens e isolar animais com sinais clínicos na propriedade são práticas que auxiliam a diminuição da transmissão de *M. agalactiae* entre os pequenos ruminantes (AL-MOMANI; NICHOLAS; ABO-SHEHADA, 2008).

1.4.5 Patogênese e sinais clínicos

O período de incubação de *M. agalactiae* em caprinos e ovinos varia de alguns dias à algumas semanas ou até dois meses dependendo da via de infecção,

número e virulência do micro-organismo, e da imunidade do animal. Dependendo dessas condições, o agente etiológico pode causar doenças aguda, subaguda ou crônica (KUMAR et al., 2014). Em casos de primo-infecção, observa-se em animais infectados, inicialmente, febre devido à bacteremia. Após disseminação hematogênica, os micro-organismos podem atingir pulmões, nódulos linfáticos, olhos, glândulas mamárias e articulações promovendo vários sinais clínicos. Embora lesões pulmonares não tenham sido comumente observadas em casos de *M. agalactiae,* esse micro-organismo já foi isolado em surto de pleurisia em cabras. Infecções oculares podem levar a lesões severas de córnea, podendo acarretar em cegueira através da vascularização e ceratoconjuntivite. A infecção das glândulas mamárias causa atrofia do órgão e diminuição ou supressão da produção de leite. A artrite é causada pelo inchaço doloroso e acúmulo de líquido sinovial principalmente nas articulações do carpo e do tarso. Em doenças crônicas há casos de ancilose (perda da motilidade da articulação). Infecções genitais estão relacionadas a abortos ou natimortos, principalmente devido a inflamações do útero. Vulvovaginite granular em fêmeas e inflamação testicular também têm sido descritos (KUMAR et al., 2014). Como reportado acima, formas assintomáticas também podem ocorrer, uma vez que se observou que o agente etiológico pode ser eliminado pelo leite e outros fluidos corporais por 12 meses a oito anos na ausência de sinais clínicos em caprinos (ADDIS et al., 2011; BERGONIER; BERTHELOT; POUMARAT, 1997; COTTEW; LLYOYD, 1965; DAMASSA; WAKENELL; BROOKS, 1992; GLEW et al., 2000; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001).

1.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da AC é baseado na presença de sintomas clínicos típicos relacionados à essa doença, entretanto, precisa ser confirmado por procedimentos laboratoriais. O diagnóstico definitivo para AC requer o isolamento do agente etiológico e sua identificação através de testes bioquímicos, sorológicos e moleculares a partir de amostras de leite, *swabs* auriculares e de conjuntiva, e fluídos articulares, como recomendado pela OIE (OIE, 2013), embora amostras de sangue (para isolar bactérias no estágio agudo da doença), *swabs* vaginais e amostras de tecidos *post mortem* (tecidos da glândula mamária, linfonodos ou pulmão) também podem ser analisadas (CORRALES et al., 2007). O primeiro teste a

ser realizado após isolamento é a avaliação à sensibilidade à digitonina, o qual distingue micoplasmas de *Acholeaplasmas* spp. Em meio sólido, a característica de "películas e machas" diferenciam o *M. agalactiae* dos outros agentes etiológicos, assim como a atividade proteolítica de *M. capricolum* subsp. *capricolum* e *M. mycoides* subsp. *capri* em meios contendo caseína. No entanto, estas características bioquímicas são variáveis e têm pouca confiabilidade para o diagnóstico. Um teste bioquímico colorimétrico rápido baseado na atividade da esterase C8 de *M. agalactiae* também tem sido descrito, embora essa atividade seja encontrada também em *M. bovis.* A caracterização dos isolados por testes sorológicos é realizada para detecção de anticorpos nos soros dos animais por teste de fixação do complemento, *imunoblotting* ou ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Estão disponíveis dois *kits* de ELISA comerciais para diagnóstico de infecções provocadas por *M. agalactiae.* Entretanto, no geral, não são testes sensíveis em infecções crônicas, possuem baixa sensibilidade à algumas estirpes, e fornecem resultados variados de acordo com a espécie hospedeira e origem geográfica das amostras. Ensaios de PCR convencional e PCR em Tempo Real são utilizados por serem extremamente sensíveis embora resultados negativos não devem ser considerados definitivos e resultados positivos em áreas consideradas livres da agalaxia contagiosa devem ser confirmadas por isolamento, caracterização bioquímica e sorológica. Contudo, de acordo com a OIE, a ausência da disponibilidade de testes de diagnósticos em alguns países indicam que a agalaxia contagiosa seja sub notificada (KUMAR et al., 2014; NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008; OIE, 2013; POUMARAT et al., 2012).

1.4.7 Vacinas: Prevenção e controle

A terapia antimicrobiana está entre as principais formas para o controle da AC e consiste, principalmente, em fluoroquinolonas, tetraciclinas e macrolídeos. Entretanto, durante o tratamento torna-se necessário um período de retenção do animal que resulta em perdas na produção de leite. Além disso, a presença de resíduos de antimicrobianos no leite constitui-se em risco na qualidade de fermentação bacteriana na produção de queijo. E apesar da susceptibilidade de *M. agalactiae* à fluoroquinolonas e sua boa penetração nos tecidos, estes antibióticos não são capazes de eliminar o patógeno do canal auditivo externo de animais

afetados, além de provocar a imobilidade de espermatozoides. Dessa forma, se a dose terapêutica não é exatamente definida e o antibiótico não é administrado por um período suficientemente longo, o efeito terapêutico pode ser mínimo ou nenhum. Os agentes etiológicos da AC continuam a ser disseminados no ambiente e há a possibilidade da ocorrência de estirpes resistentes (ASSUNÇÃO et al., 2006a; GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013; LORIA et al., 2003; MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Devido as desvantagens da terapia antimicrobiana as vacinas são alternativas no controle da agalaxia contagiosa.

As estratégias de vacinação contra AC em ovinos e caprinos são baseados em vacinas atenuadas ou inativadas. As vacinas atenuadas de culturas de *M. agalactiae* são mais eficazes do que as vacinas inativadas, mas seu uso não é permitido em todos os países afetados pela AC. Com a administração de vacina atenuada em animais infectados ocorre a normalização da lactação e as lesões articulares diminuem, mas os patógenos continuam a ser excretados pelo leite por vários meses. Se os animais saudáveis são vacinados preventivamente, não há infecção generalizada e desenvolvimento de sinais clínicos, mas pode ocorrer a infecção temporária do úbere. As vacinas inativadas não possuem as desvantagens mencionadas, mas a resposta imune é baixa a ponto de serem utilizadas apenas ocasionalmente (MADANAT; ZENDULKOVÁ; POSPÍŠIL, 2001). Vacinas comerciais contra *M. agalactiae*, inativadas com formalina, são amplamente utilizados no Sul da Europa, enquanto vacinas atenuadas são utilizadas na Turquia, mas existem poucos dados para avaliar a sua eficácia (NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008). Os melhores resultados clínicos com vacinas inativadas têm sido observados na presença de saponina como adjuvante (LORIA et al., 2003; NICHOLAS; AYLING; LORIA, 2008; TOLA et al., 1999).

Vacinas inativadas combinadas com dois agentes etiológicos da AC (*M. agalactiae* e *M. mycoides* subsp. *capri)* também têm sido avaliadas. Nesse relato, formaldeído ou fenol foram usados como agentes inativantes e hidróxido de alumínio e saponina foram usados como adjuvantes. Anticorpos contra os micro-organismos avaliados foram detectados após sete meses da imunização em cabras lactantes, mas melhores resultados foram observados em vacinas inativadas pelo fenol (DE LA FE et al., 2007b). Em estudo similar foi evidenciado que hidróxido de alumínio associado com saponina e inativação com formaldeído atenua sinais clínicos da agalaxia contagiosa mas não previne infecções por *M. agalactiae.* Entretanto, nesse

estudo, não foi observado nenhuma espécie de micoplasma sendo liberada pelo leite após a imunização (DE LA FE et al., 2007a).

Em ovelhas, os resultados são variados. Vacinas vivas e inativadas foram administradas em animais lactantes e foi observado que a vacina inativada com formalina não preveniu os sintomas, entretanto a doença desenvolvida não foi igualmente severa comparando-se com animais não vacinados (FOGGIE et al., 1971). Posteriormente, foi relatado que vacinas inativadas com saponina e fenol fornecem melhores resultados na proteção da infecção contra *M. agalactiae*, em ovelhas (TOLA et al., 1999). Resultado promissor também foi observado em vacinas emulsionadas em óleos minerais como adjuvantes (BUONAVOGLIA et al., 2008).

Ao avaliar a resposta imune desenvolvida contra *M. agalactiae* inativado com formalina associado a diversos adjuvantes diferentes em camundongos foi demonstrado que o ácido polinosínico – policisdilico foi o adjuvante mais eficiente em promover resposta mediada por Th1. Demonstrando assim, uma possível maneira de melhorar as vacinais disponíveis (AVRAMIDIS et al., 2002)

No Brasil, não há vacinas comerciais e regulamentação quanto ao seus usos na prevenção da agalaxia contagiosa. Nesse intuito, um estudo nacional, avaliou a eficácia de vacinas oleosas e aquosas comerciais europeias em cabritos. A primeira foi capaz de induzir níveis mais elevados e duradouros (de no mínimo sete meses após a administração da primeira dose) quando comparada com a segunda (ALCÂNTARA et al., 2013).

A vacinação é considerada adequada em regiões endêmicas e em áreas com baixo padrão social e econômico. Nesses países o desenvolvimento de vacinas de nova geração contra agalaxia contagiosa são necessárias (MADANAT, ZENDULKOVÁ, POSPÍSIL, 2001). Espera-se que uma nova geração de vacinas recombinantes nos próximos anos proporcione melhor proteção contra micoplasmas, especialmente contra as infecções por *M. agalactiae* (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013).

1.4.7.1 Vacinologia Reversa

Nas últimas décadas a área de vacinologia avançou bastante principalmente pela tecnologia do DNA recombinante que auxilia no desenvolvimento de vacinas de subunidades baseadas em antígenos específicos. Inicialmente, identificam-se os fatores importantes na patogênese e imunidade e então, os fatores identificados são

produzidos em maior quantidade. Os avanços na tecnologia genômica também permitiram o desenvolvimento de vacinas. A disponibilidade de genomas completos e avanços na biologia molecular permitem que cada possível antígeno de um patógeno possa ser avaliado quanto a habilidade de induzir uma resposta imune protetora (ADU-BOBIE et al., 2003).

A vacinologia reversa melhorou as vacinas meningocócicas contra o sorogrupo B com base em proteínas conservadas, por exemplo. As novas vacinas contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo B possuem ampla cobertura, incluindo proteção para estirpes que não são do sorogrupo B (CRUM-CIANFLONE; SULLIVAN, 2016). Da mesma forma, vacinas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) possuem grande impacto na redução de crianças infectadas (SWINGLER; MICHAELS; HUSSEY, 2007).

Em micoplasmas, as proteínas integrais e associadas a membrana estão expostas ao ambiente que esses micro-organismos se encontram e desempenham importante papel na sobrevivência e patogênese do agente. Estas proteínas são antigênicas e podem proporcionar novos alvos para o desenvolvimento de vacinas e terapia (CACCIOTTO et al., 2010). Peptídeos sintéticos são alternativas vacinais interessantes; são seletivos, possuem curtas sequências de aminoácidos conhecidos com epítopos, e são mais estáveis no armazenamento e transporte, características favoráveis na veterinária (SANTONA et al., 2002). Neste contexto, diversas proteínas recombinantes de membrana estão sendo estudadas e sugeridas como possíveis alvos na prevenção de infecções de *M. hyopneumoniae* (GALLI et al., 2012, 2013; JORGE et al., 2014; LEE et al., 2014; MARCHIORO et al., 2014a, 2014b)*; M. mycoides* subsp. *mycoides SC* (HAMSTEN et al., 2008); *M. genitalium* (LI et al., 2010)*; M. ovipneumoniae* (LI et al., 2011); *M. haemofelis* (MESSICK; SANTOS, 2011)*; M. pneumoniae* (SCHURWANZ; JACOBS; DUMKE, 2009)*; M. gallisepticum* (YOSHIDA et al., 2000)*.*

Especificamente em *M. agalactiae,* poucos antígenos de membrana foram identificados como imunogênicos e estão sendo estudados como potenciais alvos para o controle da AC. A proteína P30 consiste em um antígeno imunodominante, expresso nos sorotipos A a D de *M. agalactiae,* que induz resposta imune inicial intensa e persistente em animais infectados (FLEURY et al., 2001). A citoadesina P40, também é caracterizada como fortemente imunogênica, com indução de anticorpos no início da infecção em ovelhas. É expressa por todos os sorotipos,

exceto o sorotipo C (FLEURY et al., 2002). A proteína P48 induziu significante resposta imune em camundongos imunizados sendo considerado também um importante antígeno imunodominante (CHESSA et al., 2009; ROSATI et al., 1999). A lipoproteína MAG_5040 tem sido caracterizada como uma proteína antigênica com atividade de nuclease potencialmente envolvida na patogenicidade de *M. agalactiae* (CACCIOTTO et al., 2013) Entretanto, apesar do progresso nos estudos sobre métodos terapêuticos e de prevenção, estratégias preventivas ainda permanecem ineficientes no controle da AC. Dessa forma, a determinação de mais alvos antigênicos e consequente geração de uma nova alternativa vacinal que proporcione melhor proteção contra infecções por *M. agalactiae* são ainda necessárias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram identificadas e selecionadas quatro proteínas de membrana de *M. agalactiae* possivelmente antigênicas através de análises de bioinformática;

- As quatro sequências proteicas selecionadas foram expressas em *E. coli* como hospedeiro heterólogo e purificadas;

- Todas as proteínas recombinantes purificadas foram reconhecidas aos soros de caprinos naturalmente infectados pelo *M. agalactiae.*

- Os resultados auxiliam a identificação de alvos para vacinas de subunidades e testes imunológicos para Agalaxia contagiosa em animais infectados pelo *M. agalactiae.*

REFERÊNCIAS*

ABDO, E. M.; NICOLET, J.; FREY, J. Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 7, n. 4, p. 588–595, jul. 2000. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=95919&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ADDIS, M. F.; PISANU, S.; GHISAURA, S.; PAGNOZZI, D.; MAROGNA, G.; TANCA, A.; BIOSA, G.; CACCIOTTO, C.; ALBERTI, A.; PITTAU, M.; ROGGIO, T.; UZZAU, S. Proteomics and pathway analyses of the milk fat globule in sheep naturally infected by Mycoplasma agalactiae provide indications of the in vivo response of the mammary epithelium to bacterial infection. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3833–3845, set. 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3165467&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; SERRUTO, D.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Two years into reverse vaccinology. **Vaccine**, v. 21, p. 605-610, 2003.

ALBERTI, A.; ROBINO, P.; CHESSA, B.; ROSATI, S.; ADDIS, M. F.; MERCIER, P.; MANNELLI, A.; CUBEDDU, T.; PROFITI, M.; BANDINO, E.; THIERY, R.; PITTAU, M. Characterisation of Mycoplasma capricolum P60 surface lipoprotein and its evaluation in a recombinant ELISA. **Veterinary Microbiology**, v. 128, n. 1-2, p. 81–89, abr. 2008. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113507004804>.

ALCÂNTARA, M. D. B.; CAMPOS, A. C.; MELO, M. A.; PEREIRA FILHO, J. M.; NASCIMENTO, E. R.; FARIAS, A. A.; SOUSA, D. R. M.; AZEVEDO, E. O. Resposta imunológica em caprinos vacinados contra agalaxia contagiosa. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 561–564, maio 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000500001&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 13 nov. 2015.

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, 1 jan. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881071>. Acesso em: 2 out. 2014.

ALVA, V.; NAM, S.-Z.; SÖDING, J.; LUPAS, A. N. The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. April 2016, p. gkw348, 2016. Disponível em: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkw348>.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: Referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALVES, B. H. L. S.; SILVA, J. G.; MOTA, A. R.; CAMPOS, A. C.; JÚNIOR, J. W. P.; SANTOS, B.; MOTA, R. A. Mycoplasma agalactiae in semen and milk of goat from. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 11, p. 1309–1312, 2013.

AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J. C.; SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1265–1270, 15 abr. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220162>. Acesso em: 2 out. 2014.

ANDERSEN, H. P; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Sci.** 15:2558-2567, 2006.

ANSARI, H. R.; RAGHAVA, G. P. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. **Immunome Research**, v. 6, n. 1, p. 6, 2010. Disponível em: <http://www.immunome-research.com/content/6/1/6>.

ARIZA-MIGUEL, J.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. A survey of Mycoplasma agalactiae in dairy sheep farms in Spain. **BMC veterinary research**, v. 8, n. September, p. 171, jan. 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3514350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

ARIZA-MIGUEL, J.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D.; HERNÁNDEZ, M. Molecular characterization of Mycoplasma agalactiae reveals the presence of an endemic clone in Spain. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 2, p. 656–560, fev. 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3553876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

ASSIS, L. M.; SOUSA, J. R.; PINTO, N. F. S.; SILVA, A. A.; VAZ, A. F. M.; ANDRADE, P. P.; CARVALHO, E. M.; DE MELO, M. A. B-cell epitopes of antigenic proteins in Leishmania infantum: An in silico analysis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 7, p. 313–323, 2014.

ASSUNÇÃO, P.; ANTUNES, N. T.; ROSALES, R. S.; DE LA FE, C.; POVEDA, C.; POVEDA, J. B.; DAVEY, H. M. Flow cytometric method for the assessment of the minimal inhibitory concentrations of antibacterial agents to Mycoplasma agalactiae. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 69, n. 10, p. 1071–1076, 1 out. 2006a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16998868>.

ASSUNÇÃO, P.; ANTUNES, N. T.; ROSALES, R. S.; POVEDA, C.; POVEDA, J. B.; DAVEY, H. M. Flow cytometric determination of the effects of antibacterial agents on Mycoplasma agalactiae, Mycoplasma putrefaciens, Mycoplasma capricolum subsp. capricolum, and Mycoplasma mycoides subsp. mycoides large colony type. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2845–2849, ago. 2006b. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1538642&tool=pmcentre

z&rendertype=abstract>. Acesso em: 29 set. 2014.

ASSUNÇÃO, P.; DAVEY, H. M.; ROSALES, R. S.; ANTUNES, N. T.; DE LA FE, C.; RAMIREZ, A. S.; DE GALARRETA, C. M. R.; POVEDA, J. B. Detection of mycoplasmas in goat milk by flow cytometry. **Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 71, n. 12, p. 1034–1038, dez. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972304>. Acesso em: 2 out. 2014.

ATAEE, R. A.; GOLMOHAMMADI, R.; ALISHIRI, G. H.; MIRNEJAD, R.; NAJAFI, A.; ESMAEILI, D.; JONAIDI-JAFARI, N. Simultaneous detection of mycoplasma pneumoniae, mycoplasma hominis and mycoplasma arthritidis in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis by multiplex PCR. **Archives of Iranian Medicine**, v. 18, n. 6, p. 345–350, 2015.

AVRAMIDIS, N.; VICTORATOS, P.; YIANGOU, M.; HADJIPETROU-KOUROUNAKIS, L. Adjuvant regulation of cytokine profile and antibody isotype of immune responses to Mycoplasma agalactiae in mice. **Veterinary microbiology**, v. 88, n. 4, p. 325–338, 24 set. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220808>.

AYLING, R. D.; BASHIRUDDIN, S. E.; NICHOLAS, R. a J. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. **The Veterinary record**, v. 155, n. 14, p. 413–416, 2004.

BAI, F.; NI, B.; LIU, M.; FENG, Z.; XIONG, Q.; SHAO, G. Mycoplasma hyopneumoniae-derived lipid-associated membrane proteins induce inflammation and apoptosis in porcine peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Veterinary Microbiology**, v. 175, n. 1, p. 58–67, 2015.

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**, p. 1255–1258, 2008.

BARANOWSKI, E.; GUIRAL, S.; SAGNÉ, E.; SKAPSKI, A.; CITTI, C. Critical role of dispensable genes in Mycoplasma agalactiae interaction with mammalian cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1542–1551, abr. 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2849427&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging, and Burdened by Their Notoriety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 21–32, 1997.

BEAMAN, K. D.; POLLACK, J. D. Synthesis of adenylate nucleotides by Mollicutes (mycoplasmas). **Journal of general microbiology**, v. 129, n. 10, p. 3103–3110, 1983.

BECKER, C. a M.; 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**, v. 90, n. 2, p. 73–79, ago. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579581>. Acesso em: 2 out. 2014.

BELLOY, L.; VILEI, E. M.; GIACOMETTI, M.; FREY, J. Characterization of LppS, an adhesin of Mycoplasma conjunctivae. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 185–193, 2003.

BENCINA, D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A**, v. 31, n. 6, p. 535–547, 2002. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0307945021000024526?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed&>.

BERGEY, D. H. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. In: _____2. ed. **Manual of systematic bacteriology.** New York: Springer-Verlag, 2010, v. 4, 721 p.

BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: Current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. **Revue scientifique et technique (International office of epizootics)**, v. 16, n. 3, p. 848–873, 1997.

BERGONIER, D.; DE SIMONE, F.; RUSSO, P.; SOLSONA, M.; LAMBERT, M.; POUMARAT, F. Variable expression and geographic distribution of Mycoplasma agalactiae surface epitopes demonstrated with monoclonal antibodies. **FEMS Microbiology Letters**, v. 143, n. 2-3, p. 159–165, 1996.

BOESEN, T.; FEDOSOVA, N. U.; KJELDGAARD, M.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Molecular design of Mycoplasma hominis Vaa adhesin. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 10, n. 12, p. 2577–2586, dez. 2001. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2374042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

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.** Mar:28(3):495-503, 1990.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).** Caprinos e ovinos. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>.

BRENDEL, V.; BUCHER, P.; NOURBAKHSH, I. R.; BLAISDELL, B. E.; KARLIN, S. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 6, p. 2002–2006, 1992. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

BROWNING, G. F.; MARENDA, M. S.; NOORMOHAMMADI, a H.; MARKHAM, P. F. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. **Veterinary microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 44–50, 21 nov. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684094>. Acesso em: 19 nov. 2014.

BUONAVOGLIA, D.; GRECO, G.; QUARANTA, V.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N. An oil-emulsion vaccine induces full-protection against Mycoplasma agalactiae infection in sheep. **The new microbiologica**, v. 31, n. 1, p. 117–23, jan. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437850>.

BÜRKI, S.; FREY, J.; PILO, P. Virulence, persistence and dissemination of Mycoplasma bovis. **Veterinary microbiology**, v. 179, n. 1-2, p. 15–22, 31 ago. 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113515000796>. Acesso em: 9 abr. 2016.

BÜRKI, S.; GASCHEN, V.; STOFFEL, M. H.; STOJILJKOVIC, A.; FREY, J.; KUEHNI-BOGHENBOR, K.; PILO, P. Invasion and persistence of Mycoplasma bovis in embryonic calf turbinate cells. **Veterinary research**, v. 46, p. 1-14, jan. 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4432498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 8 abr. 2016.

CACCIOTTO, C.; ADDIS, M. F.; CORADDUZZA, E.; CARCANGIU, L.; NUVOLI, A. M.; TORE, G.; DORE, G. M.; PAGNOZZI, D.; UZZAU, S.; CHESSA, B.; PITTAU, M.; ALBERTI, A. Mycoplasma agalactiae MAG_5040 is a Mg2+-dependent, sugar-nonspecific SNase recognised by the host humoral response during natural infection. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57775, jan. 2013. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3585158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

CACCIOTTO, C.; ADDIS, M. F.; PAGNOZZI, D.; CHESSA, B.; CORADDUZZA, E.; CARCANGIU, L.; UZZAU, S.; ALBERTI, A.; PITTAU, M. The liposoluble proteome of Mycoplasma agalactiae: an insight into the minimal protein complement of a bacterial membrane. **BMC microbiology**, v. 10, p. 1-12, 2010.

CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between Mycoplasma Lipoproteins and the Host Immune System. **Trends in microbiology**, v. 7, n. 12, p. 493–499, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603485>.

CHAUDHURI, R.; KULSHRESHTHA,D.; RAGHUNANDANAN, M. V.; RAMACHANDRAN, S. Integrative immunoinformatics for Mycobacterial diseases in R platform. **Systems and synthetic biology,** v. 8, p. 27–39, 2014.

CHAUSSEE, M. S.; COLE, R. L.; VAN PUTTEN, J. P. M. Streptococcal erythrogenic toxin B abrogates fibronectin-dependent internalization of Streptococcus pyogenes by cultured mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3226–3232, 2000.

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. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2892444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

CHELMONSKA-SOYTA, A.; MILLER, R. B.; RUHNKE, L.; ROSENDAL, S. Activation of murine macrophages and lymphocytes by Ureaplasma diversum. **Canadian journal of veterinary research**, v. 58, n. 4, p. 275–280, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7889459>.

CHESSA, B.; PITTAU, M.; PURICELLI, M.; ZOBBA, R.; CORADDUZZA, E.; DALL, P.; ROSATI, S.; POLI, G.; ALBERTI, A. Genetic immunization with the immunodominant antigen P48 of Mycoplasma agalactiae stimulates a mixed adaptive immune response in BALBc mice. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 3, p. 414–420, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.09.010>.

CHOPRA-DEWASTHALY, R.; BAUMGARTNER, M.; GAMPER, E.; INNEREBNER, C.; ZIMMERMANN, M.; SCHILCHER, F.; TICHY, A.; WINTER, P.; JECHLINGER, W.; ROSENGARTEN, R.; SPERGSER, J. Role of Vpma phase variation in Mycoplasma agalactiae pathogenesis. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 66, n. 3, p. 307–322, dez. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22809092>. Acesso em: 2 out. 2014.

CHOPRA-DEWASTHALY, R.; CITTI, C.; GLEW, M. D.; ZIMMERMANN, M.; ROSENGARTEN, R.; JECHLINGER, W. Phase-locked mutants of Mycoplasma agalactiae: defining the molecular switch of high-frequency Vpma antigenic variation. **Molecular microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1196–210, mar. 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268961&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

CHOU, P. Y.; FASMAN, G. D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology,** v. 47, p. 45-148, 1978.

CITTI, C.; NOUVEL, L.-X.; BARANOWSKI, E. Phase and antigenic variation in mycoplasmas. **Future microbiology**, v. 5, p. 1073–1085, 2010.

CITTI, C.; WATSON-MCKOWN, R.; DROESSE, M.; WISE, K. S. Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of Mycoplasma hyorhinis. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1356–1363, 2000.

CLAROS, M. G.; VON HEIJNE, G. TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. **Cabios applications notes**, v. 10, n. 6, p. 685–686, 22 maio 1994.

COLE, B. C.; ATKIN, C. L. The Mycoplasma arthritidis T-cell mitogen MAM: a model superantigen. **Immunology Today**, v. 12, n. 8, p. 271–276, 1991.

COLE, B. C.; KNUDTSON, K. L.; OLIPHANT, A.; SAWITZKE, A. D.; POLE, A.; MANOHAR, M.; BENSON, L. S.; AHMED, E.; ATKIN, C. L. The sequence of the Mycoplasma arthritidis superantigen, MAM: identification of functional domains and comparison with microbial superantigens and plant lectin mitogens. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 3, p. 1105–1110, 1996.

CORDEIRO, P. R. C.; CORDEIRO, A. G. P. C. A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu mercado. **X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Media Mogiana**, p. 1–7, 2009.

CORRALES, J. C.; ESNAL, a.; DE LA FE, C.; SÁNCHEZ, a.; ASSUNÇAO, P.; POVEDA, J. B.; CONTRERAS, a. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 154–166, mar. 2007. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448806002513>. Acesso em: 2 out. 2014.

COTTEW, G. S.; LLYOYD, L. C. An outbreak of pleurisy and pneumonia in goats in Australia attributed to a mycoplasma species. **Journal of comparative pathology**, v. 75, 1965.

CRUM-CIANFLONE, N.; SULLIVAN, E. Meningococcal Vaccinations. **Infectious diseases and therapy**, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086142>.

CSERZO, M.; EISENHABER, F.; EISENHABER, B.; SIMON, I. On filtering false positive transmembrane protein predictions. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 15, n. 9, p. 745–752, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456873\nhttp://peds.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/protein/15.9.745>.

DAMASSA, A. J.; WAKENELL, P. S.; BROOKS, D. L. Mycoplasmas of goats and sheep. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 113, p. 101–113, 1992.

DE AZEVEDO, E. O.; DE ALCÂNTARA, M. D. B.; DO NASCIMENTO, E. R.; TABOSA, I. M.; BARRETO, M. L.; DE ALMEIDA, J. F.; ARAÚJO, M. D. O.; RODRIGUES, A. R. O.; RIET-CORREA, F.; DE CASTRO, R. S. Contagious agalactia by Mycoplasma agalactiae in small ruminants in Brazil: First report. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 576–581, 2006.

DE LA FE, C.; AMORES, J.; TARDY, F.; SAGNE, E.; NOUVEL, L.-X.; CITTI, C. Unexpected genetic diversity of Mycoplasma agalactiae caprine isolates from an endemic geographically restricted area of Spain. **BMC veterinary research**, v. 8, p. 146, jan. 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3514313&tool=pmcentre

z&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; ANTUNES, T.; ROSALES, R. S.; POVEDA, J. B. Microbiological survey for Mycoplasma spp. in a contagious agalactia endemic area. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 170, n. 2, p. 257–259, set. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964226>. Acesso em: 2 out. 2014.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; SAAVEDRA, P.; RAMÍREZ, A.; POVEDA, J. B. Field trial of a combined vaccine against caprine contagious agalactia: humoral immune response in lactating goats. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 174, n. 3, p. 610–615, nov. 2007a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17158077>. Acesso em: 2 out. 2014.

DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; SAAVEDRA, P.; TOLA, S.; POVEDA, C.; POVEDA, J. B. Field trial of two dual vaccines against Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides subsp. mycoides (large colony type) in goats. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2340–2345, 8 mar. 2007b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17239497>. Acesso em: 2 out. 2014.

DE LA FE, C.; MARTÍN, A. G.; AMORES, J.; CORRALES, J. C.; SÁNCHEZ, A.; POVEDA, J. B.; CONTRERAS, A. Latent infection of male goats with Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides subspecies capri at an artificial insemination centre. **The Veterinary Journal**, v. 186, n. 1, p. 113–115, out. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.07.010>.

DEBEY, M. C.; ROSS, R. F. Ciliostasis and loss of cilia induced by Mycoplasma hyopneumoniae in porcine tracheal organ cultures. **Infection and immunity**, v. 62, n. 12, p. 5312–5318, dez. 1994. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=303270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 8 abr. 2016.

DROZDETSKIY, A.; COLE, C.; PROCTER, J.; BARTON, G. J. JPred4: a protein secondary structure prediction server. **Nucleic acids research,** v. 43, n. 1, p. 389–394, 1 jul. 2015. Disponível em: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkv332>.

DUŠANIĆ, D.; BERČIČ, R. L.; CIZELJ, I.; SALMIČ, S.; NARAT, M.; BENČINA, D. Mycoplasma synoviae invades non-phagocytic chicken cells in vitro. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 114–119, 2009.

EMINI, E. A.; HUGHES, J. V.; PERLOW, D. S.; BOGER, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Jornal of Virology,** v. 55, p. 836-839, 1985.

FAO. **FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - STATISTICS DIVISION**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/home/E>.

FERRIS, P.; NEYROLLES, O.; CHAMBAUD, I.; BLANCHARD, A. Phase Variations

of the Mycoplasma penetrans Main Surface Lipoprotein Increase Antigenic Diversity. v. 67, n. 4, p. 1569–1578, 1999.

FILHO, A. N.; JÚNIOR, C. A. F.; YAMAMOTO, A. Mercado De Carne , Leite E Pele De Caprinos E Ovinos No Nordeste. **Série Documentos do Etene,** n. 27, p. 1-15, 2010. Disponível em: <http://www.bnb.gov.br/projwebren/Exec/livroPDF.aspx?cd_livro=159>.

FIGUEIREDO-JUNIOR, C. A; JUNIOR, A. S. V.; FILHO, A. N.; YAMAMOTO, A. O mercado da carne de ovinos e caprinos no nordeste: avanços e entraves. In: **Congresso Brasileiro De Economia E Sociologia Rural,** v. 47, p. 1 - 5, 2009.

FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; PETERHANS, E.; FREY, J.; VILEI, E. M. Characterization of P40, a cytadhesin of Mycoplasma agalactiae. **Infection and immunity**, v. 70, n. 10, p. 5612–5621, out. 2002. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=128363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; SCHLATTER, Y.; FREY, J.; VILEI, E. M. Characterization and analysis of a stable serotype-associated membrane protein (P30) of Mycoplasma agalactiae. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2814–2822, ago. 2001. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88244&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J. R.; ERDAG, O.; ARISOY, F. Contagious agalactia of sheep and goats studies on live and dead vaccines in lactating sheep. **Journal of comparative pathology**, v. 81, 1971.

GARDY, J.; BRINKMAN, F. S. L. Methods for predicting bacterial protein subcellular localization. **Nature Reviews Microbiology**. V. 4, p. 741 - 751, 2006.

GALLI, V.; SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; FISCH, A.; GOMES, C. K.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Immunisation of mice with mycoplasma hyopneumoniae antigens P37, P42, P46 and P95 delivered as recombinant subunit or DNA vaccines. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 135–140, 2012.

GALLI, V.; SIMIONATTO, S.; MARCHIORO, S. B.; KLABUNDE, G. H. F.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant secreted antigens from Mycoplasma hyopneumoniae delivered as a cocktail vaccine enhance the immune response of mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 9, p. 1370–1376, 2013.

GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., B. A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. **The Proteomics Protocols Handbook**, p. 571–607, 2005. Disponível em: <http://web.expasy.org/protparam>.

GLEW, M. D.; MARENDA, M.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. Surface diversity in Mycoplasma agalactiae is driven by site-specific DNA inversions within the vpma

multigene locus. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 21, p. 5987–5998, nov. 2002. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135373&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GLEW, M. D.; PAPAZISI, L.; POUMARAT, F.; BERGONIER, D.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in Mycoplasma agalactiae. **Infection and immunity**, v. 68, n. 8, p. 4539–4548, ago. 2000. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=98368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GÓMEZ-MARTÍN, A.; AMORES, J.; PATERNA, A.; DE LA FE, C. Contagious agalactia due to Mycoplasma spp. in small dairy ruminants: epidemiology and prospects for diagnosis and control. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 198, n. 1, p. 48–56, out. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23759248>. Acesso em: 2 out. 2014.

GONZÁLEZ-CANDELA, M.; CUBERO-PABLO, M. J.; MARTÍN-ATANCE, P.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Potential pathogens carried by Spanish ibex (Capra pyrenaica hispanica) in southern Spain. **Journal of wildlife diseases**, v. 42, n. 2, p. 325–334, 2006.

GOUJON, M.; MCWILLIAM, H.; LI, W.; VALENTIN, F.; SQUIZZATO, S.; PAERN, J.; LOPEZ, R. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 2, p. 695–699, 2010.

GREGORY, L.; CARDOSO, M. V; JUNIOR, E. H. B.; TEIXEIRA, S. R.; LARA, M. C. C. S. H.; RIZZO, H.; ANGELINI, M.; MENEGHINI, R. C. M.; BENESI, F. J. Ocorrência de artrite em ovinos causada por Mycoplasma spp. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 71, p. 233–235, 2004.

GROEBEL, K.; HOELZLE, K.; WITTENBRINK, M. M.; ZIEGLER, U.; HOELZLE, L. E. Mycoplasma suis invades porcine erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 576–584, 2009.

GUIMARAES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; TIMENETSKY, J.; BOWER, L. P.; STRAIT, E.; MESSICK, J. B. Identification of Mycoplasma suis antigens and development of a multiplex microbead immunoassay. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 26, n. 2, p. 203–212, mar. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24557752>. Acesso em: 2 out. 2014.

HAMSTEN, C.; WESTBERG, J.; BÖLSKE, G.; AYLING, R.; UHLÉN, M.; PERSSON, A. Expression and immunogenicity of six putative variable surface proteins in Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC. **Microbiology (Reading, England)**, v. 154, n. Pt 2, p. 539–549, fev. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18227258>. Acesso em: 2 out. 2014.

HEGDE, S.; GABRIEL, C.; KRAGL, M.; CHOPRA-DEWASTHALY, R. Sheep primary cells as in vitro models to investigate Mycoplasma agalactiae host cell interactions. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 7, p. ftv048, 2015. Disponível em: <http://femspd.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/femspd/ftv048>.

HEGDE, S.; HEGDE, S.; SPERGSER, 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 : IJMM**, v. 304, n. 8, p. 1024–1031, 2014.

HOELZLE, K.; GRIMM, J.; RITZMANN, M.; HEINRITZI, K.; TORGERSON, P.; HAMBURGER, A.; WITTENBRINK, M. M.; HOELZLE, L. E. Use of recombinant antigens to detect antibodies against Mycoplasma suis, with correlation of serological results to hematological findings. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 14, n. 12, p. 1616–1622, dez. 2007. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2168379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

IBGE. **Estatística de Produção Pecuária. Banco de dados**, p. 6–7, 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u2=1>.

IVERSON-CABRAL, S. L.; WOOD, G. E.; TOTTEN, P. A. Analysis of the Mycoplasma genitalium MgpB Adhesin to Predict Membrane Topology, Investigate Antibody Accessibility, Characterize Amino Acid Diversity, and Identify Functional and Immunogenic Epitopes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138244, 18 set. 2015. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0138244>.

JORGE, S.; DE OLIVEIRA, N. R.; MARCHIORO, S. B.; FISCH, A.; GOMES, C. K.; HARTLEBEN, C. P.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. The Mycoplasma hyopneumoniae recombinant heat shock protein P42 induces an immune response in pigs under field conditions. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 4, p. 229–236, 2014.

KHIARI, A. B.; MARDASSI, B. B. A. Characterization of the antigenic and functional domains of a Mycoplasma synoviae variant vlhA gene. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 3-4, p. 322–329, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.016>.

KINDE, H.; DAMASSA, a. J.; WAKENELL, P. S.; PETTY, R. Mycoplasma Infection in a Commercial Goat Dairy Caused by Mycoplasma Agalactiae and Mycoplasma Mycoides Subsp. Mycoides (Caprine Biotype). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 4, p. 423–427, 1 out. 1994. Disponível em: <http://vdi.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/104063879400600404>. Acesso em: 2 out. 2014.

KORNSPAN, J. D.; ROTTEM, S. Phospholipase A and glycerophosphodiesterase activities in the cell membrane of Mycoplasma hyorhinis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 332, n. 1, p. 34–39, 2012.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. . Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of molecular biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152613\nhttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283600943158\nhttp://ac.els-cdn.com/S0022283600943158/1-s2.0-S0022283600943158-main.pdf?_tid=207e48c4-9f55-11e5-aaee-00000aacb362&acdnat=1449762547_8e2000bc>.

KUMAR, A.; RAHAL, A.; CHAKRABORTY, S.; VERMA, A. K.; DHAMA, K. Mycoplasma agalactiae, an Etiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review. **Veterinary medicine international**, v. 2014, p. 286752, jan. 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4109668&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 24 nov. 2014.

LARSEN, J. E.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**. 2:2, 2006.

LEE, S. H.; LEE, S.; CHAE, C.; RYU, D.-Y. A recombinant chimera comprising the R1 and R2 repeat regions of M. hyopneumoniae P97 and the N-terminal region of A. pleuropneumoniae ApxIII elicits immune responses. **BMC veterinary research**, v. 10, n. 1, p. 43, jan. 2014. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3932138&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

LI, L.; KRISHNAN, M.; BASEMAN, J. B.; KANNAN, T. R. Molecular cloning, expression, and characterization of a Ca2+-dependent, membrane-associated nuclease of Mycoplasma genitalium. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 4876–4884, out. 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2944508&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

LI, M.; MA, C. J.; LIU, X. M.; ZHAO, D.; XU, Q. C.; WANG, Y. J. Molecular cloning of HSP70 in Mycoplasma ovipneumoniae and comparison with that of other mycoplasmas. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 10, n. 2, p. 834–848, jan. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21574140>. Acesso em: 2 out. 2014.

LI, W.; COWLEY, A.; ULUDAG, M.; GUR, T.; MCWILLIAM, H.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; LOPEZ, R. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. **Nucleic acids research**, v. 43, p. 580–584, 2015. Disponível em: <http://europepmc.org/articles/PMC4489272/?report=abstract>.

LORIA, G. R.; NICHOLAS, R. A. J. Contagious agalactia: The shepherd’s nightmare. **The Veterinary Journal**, v. 198, n. 1, p. 5–6, out. 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023313003018>.

LORIA, G. R.; SAMMARTINO, C.; NICHOLAS, R. a. J.; AYLING, R. D. In vitro

susceptibilities of field isolates of Mycoplasma agalactiae to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin–spectinomycin. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 1, p. 3–7, ago. 2003. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528803000304>. Acesso em: 2 out. 2014.

LYSNYANSKY, I.; YOGEV, D.; LEVISOHN, S. Molecular characterization of the Mycoplasma bovis p68 gene, encoding a basic membrane protein with homology to P48 of Mycoplasma agalactiae. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 2, p. 234–242, 2008.

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.

MADRUGA, M. S.; ARRUDA, S. G. B.; ARAÚJO, E. M.; ANDRADE, L. T.; NASCIMENTO, J. C.; COSTA, R. G. Efeito da idade de abate no valor nutritivo e sensorial da carne caprina de animais mestiços. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 1–9, 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000300014>.

MARCHIORO, S. B.; FISCH, A.; GOMES, C. K.; JORGE, S.; GALLI, V.; HAESEBROUCK, F.; MAES, D.; DELLAGOSTIN, O.; CONCEI????O, F. R. Local and systemic immune responses induced by a recombinant chimeric protein containing Mycoplasma hyopneumoniae antigens fused to the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin LTB. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 1-2, p. 166–171, 2014a.

MARCHIORO, S. B.; S??CRISTAN, R. D. P.; MICHIELS, A.; HAESEBROUCK, F.; CONCEIÇÃO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A.; MAES, D. Immune responses of a chimaeric protein vaccine containing Mycoplasma hyopneumoniae antigens and LTB against experimental M. hyopneumoniae infection in pigs. **Vaccine**, v. 32, n. 36, p. 4689–4694, 2014b.

MARQUES, L. M.; UENO, P. M.; BUZINHANI, M.; CORTEZ, B. a; NETO, R. L.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. C.; GUIMARAES, A. M. S.; MONEZI, T. a; BRAGA, A. C. R. J.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; TIMENETSKY, J. Invasion of Ureaplasma diversum in Hep-2 cells. **BMC microbiology**, v. 10, p. 1-8, 2010.

MCMANUS, C.; PAIVA, S.; LOUVANDINI, H. Caprinos no Brasil. **INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira**, p. 1–17, 2010.

MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y. M.; BUSO, N.; COWLEY, A. P.; LOPEZ, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic acids research**, v. 41, n. Web Server issue, p. 597–600, 2013.

MESSICK, J. B.; SANTOS, A. P. Identification, bioinformatics analyses, and expression of immunoreactive antigens of Mycoplasma haemofelis. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 18, n. 8, p. 1275–1281, ago. 2011. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3147356&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

MOVAHEDI, A.; HAMPSON, D. J. New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development. **Veterinary Microbiology.** 131, 1–13, 2008.

MUDADU, M. A.; CARVALHO, V.; LECLERCQ, S. Y. Nonclassically Secreted Proteins as Possible Antigens for Vaccine Development: A Reverse Vaccinology Approach. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** V 175, 7, pp 3360-3370, 2015.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends Biochem Sci.** 24:34–36, 1999.

NASCIMENTO, N., C.; SANTOS, A. P.; CHU, Y.; GUIMARAES, A. M. S.; BAIRD, A. N.; WEIL, A. B.; MESSICK, J. B. Microscopy and genomic analysis of Mycoplasma parvum strain Indiana. **Veterinary Research.** 45:86, 2014.

NICHOLAS, R. A.Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. **Small Ruminant Research**, v. 45, n. 2, p. 145–149, ago. 2002. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448802000950>.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; LORIA, G. R. Ovine mycoplasmal infections. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1-2, p. 92–98, abr. 2008. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448807002829>. Acesso em: 2 out. 2014.

NOUVEL, L. X.; MARENDA, M.; SIRAND-PUGNET, P.; SAGN??, E.; GLEW, M.; MANGENOT, S.; BARBE, V.; BARR??, A.; CLAVEROL, S.; CITTI, C. Occurrence, plasticity, and evolution of the vpma gene family, a genetic system devoted to high-frequency surface variation in Mycoplasma agalactiae. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 13, p. 4111–4121, 2009.

OIE. CONTAGIOUS AGALACTIA. In: **OIE Terrestrial Manual 2013, Chapter 2.7.5. — Contagious agalactia**. [s.l: s.n.]p. 1–9.

OIE. **OIE World Animal Health Information System WAHIS : Protecting animals , preserving our future**. Disponível em: <http://www.oie.int/>.

OPITZ, O.; JACOBS, E. Adherence epitopes of Mycoplasma genitalium adhesin. **Journal of general microbiology**, v. 138, n. 9, p. 1785–1790, 1992.

PAETZEL, M.; KARLA, A.; STRYNADKA, N. C. J.; DALBEY, R. E. Signal peptidases. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4549–4579, 2002.

PATERNA, A.; SÁNCHEZ, A.; AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J. C.; CONTRERAS, A.; DE LA FE, C. Survival of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides subspecies capri in heat treated goat colostrum. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 196, n. 2, p. 263–265, maio 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23154071>. Acesso em: 2 out. 2014.

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

PEREIRA, L. M. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante.** 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares), Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>. **Nature Methods**, 8:785-786, 2011.

PETTERSSON, B.; UHLEN, M.; JOHANSSON, K.-E. Phylogeny of Some Mycoplasmas from Ruminants Based on 16S rRNA Sequences and Definition of a New Cluster within the Hominis Group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 1093–1098, 1 out. 1996. Disponível em: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00207713-46-4-1093>.

PONOMARENKO, J. V.; BOURNE, P. E. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. **BMC Structural Biology.** n. 7, v. 64, p. 1 - 19, 2007.

POUMARAT, F.; LE GRAND, D.; GAURIVAUD, P.; GAY, E.; CHAZEL, M.; GAME, Y.; BERGONIER, D. Comparative assessment of two commonly used commercial ELISA tests for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by Mycoplasma agalactiae. **BMC veterinary research**, v. 8, p. 109, jan. 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3439703&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

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. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X16001059>.

RAZIN, S. Mycoplasma Taxonomy Studied by Electrophoresis of Cell Proteins. **Journal of Bacteriology,** v. 96, n. 3, p. 687–694, 1968.

RAZIN, S.; HERRMANN, R. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002, 589 p.

RAZIN, S.; JACOBS, E. Review Article Mycoplasma adhesion. **Journal of General Microbiology,** v. 138, p. 407–422, 1992.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094–1156, 1998.

RELICH, R. F.; BALISH, M. F. Insights into the function of Mycoplasma pneumoniae protein P30 from orthologous gene replacement. **Microbiology**, v. 157, n. 10, p. 2862–2870, 2011.

ROBINO, P.; ALBERTI, A.; PITTAU, M.; CHESSA, B.; MICILETTA, M.; NEBBIA, P.; LE GRAND, D.; ROSATI, S. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of Mycoplasma bovis. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 3-4, p. 201–209, 2005.

ROMERO-ARROYO, C. E.; JORDAN, J.; PEACOCK, S. J.; WILLBY, M. J.; FARMER, M. A.; KRAUSE, D. C. Mycoplasma pneumoniae protein P30 is required for cytadherence and associated with proper cell development. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1079–87, fev. 1999. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=93483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 8 abr. 2016.

ROSATI, S.; POZZI, S.; ROBINO, P.; MONTINARO, B.; CONTI, a; FADDA, M.; PITTAU, M. P48 major surface antigen of Mycoplasma agalactiae is homologous to a malp product of Mycoplasma fermentans and belongs to a selected family of bacterial lipoproteins. **Infection and immunity**, v. 67, n. 11, p. 6213–6216, nov. 1999. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97020&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

ROSATI, S.; ROBINO, P.; FADDA, M.; POZZI, S.; MANNELLI, a; PITTAU, M. Expression and antigenic characterization of recombinant Mycoplasma agalactiae P48 major surface protein. **Veterinary microbiology**, v. 71, n. 3-4, p. 201–210, fev. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10703704>.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiological reviews**, v. 83, n. 2, p. 417–432, abr. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663864>.

ROTTEM, S.; NAOT, Y. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 436–440, 1998.

SALMAN, M.; ROTTEM, S. The cell membrane of Mycoplasma penetrans: lipid composition and phospholipase A1 activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1235, n. 2, p. 369–377, maio 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527369580026C>. Acesso em: 9 abr. 2016.

SANTONA, A.; CARTA, F.; FRAGHÍ, P.; TURRINI, F. Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of Mycoplasma agalactiae, AvgC, with the use of synthetic peptides. **Infection and immunity**, v. 70, n. 1, p. 171–176, jan. 2002. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127643&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

SCHMIDT, J. A.; BROWNING, G. F.; MARKHAM, P. F. Mycoplasma hyopneumoniae

mhp379 is a Ca2+-dependent, sugar-nonspecific exonuclease exposed on the cell surface. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 3414–3424, 2007.

SCHURWANZ, N.; JACOBS, E.; DUMKE, R. Strategy to create chimeric proteins derived from functional adhesin regions of Mycoplasma pneumoniae for vaccine development. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 5007–5015, nov. 2009. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

SHIBATA, K. I.; SASAKI, T.; WATANABE, T. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipases C in the membrane. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 4174–4177, 1995.

SHIO, M. T.; HASSAN, G. S.; SHAH, W. A.; NADIRI, A.; EL FAKHRY, Y.; LI, H.; MOURAD, W. Coexpression of TLR2 or TLR4 with HLA-DR potentiates the superantigenic activities of Mycoplasma arthritidis-derived mitogen. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 6, p. 2543–2550, 2014.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011. Disponível em: <http://msb.embopress.org/content/7/1/539.abstract>.

SILVA, F. L. R. Da; ARAÚJO, A. M. De. Desempenho produtivo em caprinos mestiços no semi-árido do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1028–1035, 2000.

SILVA, N. S.; AZEVEDO, E. O.; CAMPOS, A. C.; CORDEIRO, A. A.; MAMEDE, A. G.; SILVA, R. B. S.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, E. R.; MARINHO, M. L. Infecção congênita em cabritos por Mycoplasma agalactiae. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 631–634, abr. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v66n2/44.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2015.

SIRAND-PUGNET, P.; LARTIGUE, C.; MARENDA, M.; JACOB, D.; BARRÉ, A.; BARBE, V.; SCHENOWITZ, C.; MANGENOT, S.; COULOUX, A.; SEGURENS, B.; DE DARUVAR, A.; BLANCHARD, A.; CITTI, C. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. **PLoS genetics**, v. 3, n. 5, p. e75, 18 maio 2007. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1868952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 24 nov. 2014.

SOLSONA, M.; LAMBERT, M.; POUMARAT, F. Genomic, protein homogeneity and antigenic variability of Mycoplasma agalactiae. **Veterinary microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 45–58, maio 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8810007>.

SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences.

Proceedings/ International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, v. 6, p. 175–182, 1998.

STOTHARD, P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **BioTechniques.** 28: 1102-1104, 2000.

SUN, P.; JU, H.; LIU, Z.; NING, Q.; ZHANG, J.; ZHAO, X.; HUANG, Y.; MA, Z.; LI, Y. Bioinformatics resources and tools for conformational B-cell epitope prediction. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 6, p. 1-6, 2013.

SVENSTRUP, H. F.; NIELSEN, P. K.; DRASBEK, M.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Adhesion and inhibition assay of Mycoplasma genitalium and M. pneumoniae by immunofluorescence microscopy. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 361–373, 2002.

SWINGLER, G. H.; MICHAELS, D.; HUSSEY, G. G. Conjugate vaccines for preventing Haemophilus influenzae type B infections. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. 1-16, 2007.

TALUKDAR, S.; ZUTSHI, S.; PRASHANTH, K. S.; SAIKIA, K. K.; KUMAR, P. Identification of Potential Vaccine Candidates Against Streptococcus pneumoniae by Reverse Vaccinology Approach. **Applied biochemistry and biotechnology.** v. 172, p. 3026–3041, 2014.

TARDY, F.; BARANOWSKI, E.; NOUVEL, L.-X.; MICK, V.; MANSO-SILVÀN, 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**, v. 78, n. 13, p. 4659–4668, jul. 2012. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3370481&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

TOLA, S.; ANGIOI, a; ROCCHIGIANI, a M.; IDINI, G.; MANUNTA, D.; GALLERI, G.; LEORI, G. Detection of Mycoplasma agalactiae in sheep milk samples by polymerase chain reaction. **Veterinary microbiology**, v. 54, n. 1, p. 17–22, jan. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050167>.

TOLA, S.; CROBEDDU, S.; CHESSA, G.; UZZAU, S.; IDINI, G.; IBBA, B.; ROCCA, S. Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of Mycoplasma agalactiae. **FEMS microbiology letters**, v. 202, n. 1, p. 45–50, 7 ago. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11506906>.

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

TOLA, S.; MANUNTA, D.; ROCCA, S.; ROCCHIGIANI, a M.; IDINI, G.; ANGIOI, P.

P.; LEORI, G. Experimental vaccination against Mycoplasma agalactiae using different inactivated vaccines. **Vaccine**, v. 17, n. 22, p. 2764–2768, 16 jul. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438045>.

TSIRIGOS, K. D.; PETERS, C.; SHU, N.; KÄLL, L.; ELOFSSON, A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W401–W407, 1 jul. 2015. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4489233&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

UENO, P. M.; TIMENETSKY, J.; CENTONZE, V. E.; WEWER, J. J.; CAGLE, M.; STEIN, M. A.; KRISHNAN, M.; BASEMAN, J. B. Interaction of Mycoplasma genitalium with host cells: Evidence for nuclear localization. **Microbiology**, v. 154, n. 10, p. 3033–3041, 2008.

VAN DER MERWE, J.; PRYSLIAK, T.; PEREZ-CASAL, J. Invasion of bovine peripheral blood mononuclear cells and erythrocytes by Mycoplasma bovis. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4570–4578, nov. 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2976333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 8 abr. 2016.

VARSHNEY, A. K.; CHAUDHRY, R.; KABRA, S. K.; MALHOTRA, P. Cloning, expression, and immunological characterization of the P30 protein of Mycoplasma pneumoniae. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 15, n. 2, p. 215–220, fev. 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2238052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2 out. 2014.

VERBISCK, G.; GONZALEZ-CANDELA, M.; CUBERO, M. J.; LEON, L.; SERRANO, E.; PERALES, A. Mycoplasma agalactiae in Iberian ibex (Capra pyrenaica) in Spain. **Veterinary Record**, v. 167, n. 11, p. 425–426, 11 set. 2010. Disponível em: <http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.c4908>.

VERBISCK-BUCKER, G.; GONZÁLEZ-CANDELA, M.; GALIÁN, J.; CUBERO-PABLO, M. J.; MARTÍN-ATANCE, P.; LEÓN-VIZCAÍNO, L. Epidemiology of Mycoplasma agalactiae infection in free-ranging Spanish ibex (Capra pyrenaica) in Andalusia, southern Spain. **Journal of wildlife diseases**, v. 44, n. 2, p. 369–280, abr. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436669>.

WAITES, K. B.; TALKINGTON, D. F. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. **Society**, v. 17, n. 4, p. 697–728, 2004.

WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. In vitro cell invasion of Mycoplasma gallisepticum. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4238–44, 2000. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=101734&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

XIONG, Q.; WANG, J.; JI, Y.; NI, B.; ZHANG, B.; MA, Q.; WEI, Y.; XIAO, S.; FENG, Z.; LIU, M.; SHAO, G. The functions of the variable lipoprotein family of Mycoplasma

hyorhinis in adherence to host cells. **Veterinary Microbiology**, v. 186, p. 82–89, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113516300177>.

YOSHIDA, S.; FUJISAWA, a; TSUZAKI, Y.; SAITOH, S. Identification and expression of a Mycoplasma gallisepticum surface antigen recognized by a monoclonal antibody capable of inhibiting both growth and metabolism. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3186–3192, jun. 2000. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

YOU, X.; ZENG, Y.; WU, Y. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 7, n. 5, p. 342–350, 2006.

YU, N. Y.; WAGNER, J. R.; LAIRD, M. R.; MELL, G.; REY, S.; LO, R.; DAO, P.; SAHINALP, S. C.; ESTER, M.; FOSTER, L. J.; BRINKMAN, F. S. L. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. **Bioinformatics.** v. 26, n. 13, p. 1608-1615, 2010.

ZEN, S.; SANTOS, M. C.; MONTEIRO, C. M. Evolução da caprino e ovinocultura. **Ativos ovinos e caprinos,** v. 1, p. 8-11, 2011.