

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E  
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

**SAMIRA MORAES CUNHA DE MESQUITA**

**ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma bovis*  
EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO E LEITE BOVINO**

UNIVERSIDADE  
FEDERAL  
FLUMINENSE

NITERÓI  
2013

SAMIRA MORAES CUNHA DE MESQUITA

**ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma bovis*  
EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO E LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientador: Professor Doutor ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO

Co-orientadora: Professora Doutora MARIA LÚCIA BARRETO

Niterói  
2013

Mesquita, Samira Moraes Cunha de  
ELISA indireto para diagnóstico de *Mycoplasma*  
bovis em amostras de soro sanguíneo e leite  
bovino/Samira Moraes Cunha de Mesquita; orientador  
Elmiro Rosendo do Nascimento. - 2013.  
49f.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária -  
Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de  
Produtos de Origem Animal)- Universidade Federal  
Fluminense, 2013.

Orientador: Elmiro Rosendo do Nascimento

1. Bovino de leite. 2. ELISA. 3. Imunização.  
4. Infecção por *Mycoplasma*. I. Título.

CDD 636.2142

SAMIRA MORAES CUNHA DE MESQUITA

**ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma bovis*  
EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO E LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em fevereiro de 2013.

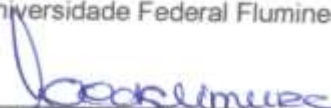
BANCA EXAMINADORA



\_\_\_\_\_  
Professor Doutor Elmiro Rosendo do Nascimento - Orientador  
Universidade Federal Fluminense



\_\_\_\_\_  
Professora Doutora Maria Lúcia Barreto - Co-orientadora  
Universidade Federal Fluminense



\_\_\_\_\_  
Doutora Leda Maria Silva Kimura  
Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

Niterói  
2013

Dedico essa conquista aos meus pais, Marcos Mesquita e Mariza Moraes, e à minha irmã, Samara Mesquita, que me lembram todos os dias que somos feitos da mesma substância da qual os sonhos são feitos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que me abençoou e me guiou pelos caminhos corretos.

Aos meus pais que me ensinaram a acreditar e perseverar pelo que desejo.

À minha irmã que me apoiou quase incondicionalmente.

À minha tia (e madrinha!) e às minhas avós que me ensinaram a ter fé.

Aos meus amigos, Aline Alves, Ana Cláudia Menezes, Carolina Eiras, Felipe Faccini, Felipe Jansen, Filipe Carvalho, Liana Lumi, Maíra Cardoso, Mariana Guedes, Marianna Azevedo, Mariza Manes, Paula Veiga, Rafael Xavier e Raquel Silva, por toda a energia positiva que me transmitiram. Agradeço especialmente ao Felipe Jansen pelo valioso auxílio durante a execução deste trabalho.

Ao meu orientador Professor Doutor Elmiro Rosendo do Nascimento por todos os ensinamentos e atenção dedicada a mim.

À minha co-orientadora Professora Doutora Maria Lúcia Barreto pela orientação e disponibilização do laboratório para a realização deste trabalho.

À pesquisadora Leda Maria Silva Kimura por disponibilizar as amostras de soro sanguíneo bovino para serem testadas neste trabalho.

Aos professores do programa de pós-graduação e do curso de graduação em medicina veterinária que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

A todos que, mesmo não tendo os seus nomes citados aqui, participaram da minha vida e contribuíram para a minha formação, permitindo que chegasse aqui.

“Entre o conhecimento do que realmente existe e a ignorância do que não existe, fica o domínio da opinião. É mais obscura que o conhecimento, porém, mais clara que a ignorância.”

(Platão)

## RESUMO

A bovinocultura é um dos destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial e o desempenho produtivo de um rebanho depende, dentre outros fatores, da eficácia de diversas medidas profiláticas. Pesquisadores internacionais apresentaram resultados indicativos do envolvimento frequente de *Mycoplasma* spp. como agente causador de mastite em bovinos, associando sua presença com perdas econômicas significativas para os criadores. *Mycoplasma bovis* é a espécie que causa a doença mais grave. Os níveis de anticorpos contra *M. bovis* permanecem elevados por muitos meses e podem ser detectados pelo ELISA. O objetivo do presente trabalho foi padronizar um ELISA indireto, com antígeno celular total de *M. bovis* (cepa Donetta PG 45), para detecção de anticorpos anti-*M. bovis* com posterior aplicação em amostras de soro sanguíneo e leite de vacas. A imunização das vacas A e B, para obtenção de soro sanguíneo e leite hiperimune com imunógeno de *M. bovis* foi a primeira etapa do trabalho. Em seguida, procedeu-se à etapa de padronização do ELISA indireto e após serem realizadas análises estatísticas, optou-se por utilizar a concentração de 2 µg de antígeno/mL para sensibilização das placas de microtitulação, nos 2 ensaios padronizados. O valor de densidade ótica 0,2 foi estabelecido como ponto de corte. Foram utilizadas como controles positivos dos ensaios as amostras de soro sanguíneo e leite hiperimunes da vaca A (coletados 30 dias após a imunização) e, como controles negativos dos ensaios foram utilizadas as amostras de soro fetal bovino estéril e leite UAT. Além disso, as diluições consideradas ideais para as amostras de soro sanguíneo, para as amostras de leite e para o conjugado utilizado foram respectivamente 1:400, 1:10 e 1:10.000 e o substrato utilizado foi a Orto-fenilenodiamina. Para a aplicação do ELISA indireto foram obtidas 321 amostras de soro sanguíneo de vacas de 15 fazendas e 47 amostras de leite de vacas de 4 fazendas. As prevalências encontradas foram 3,1% (10/321) nas amostras de soro sanguíneo e 46,7% (7/15) entre as respectivas fazendas estudadas, enquanto a prevalência de 14,9% (7/47) foi obtida nas amostras de leite e a prevalência de 100% (4/4) foi obtida entre as respectivas fazendas estudadas. A padronização do ELISA indireto apresentou parâmetros satisfatórios, portanto foi possível aplicá-lo em amostras de soro sanguíneo e leite. Na aplicação do ELISA indireto foram diagnosticados animais que já foram infectados por *M. bovis* e as prevalências obtidas entre as fazendas estudadas foram mais significativas que as prevalências obtidas entre as amostras testadas.

**Palavras-chave:** Bovino. Micoplasmose. Imunização. ELISA.



## ABSTRACT

The cattle farming is one of the highlights of Brazilian agribusiness on the world and the productive performance of the herd depends of, among other factors, the effectiveness of various prophylactic measures. International researchers presented results indicating frequent involvement of *Mycoplasma* spp. as a causative agent of mastitis in cattle, associating its presence with significant economic losses to farmers. *Mycoplasma bovis* is the species most reported and relevant, because it causes a severe disease. The level of antibodies against *M. bovis* remains high for several months and can be detected by ELISA. The aim of this work was to standardize an indirect ELISA, with whole cell antigen of *M. bovis* (strain Donetta PG 45), for detection of antibodies against *M. bovis* with following application to blood serum and milk samples obtained from cows. The immunization of cows A and B by inoculating an immunogen against *M. bovis* to obtain hyperimmune blood serum and hyperimmune milk was the first stage of this work, and then the stage of standardization of ELISA was proceeded. The concentration of 2 µg antigen/mL for coating the microtiter plates, in both standardized assays, was decided by statistical analyses. The optical density value 0,2 was determined as the limit of reactivity discrimination of samples (the cut-off point). The hyperimmune blood serum and the hyperimmune milk of the cow A (collected 30 days after immunization) were chosen as the positive controls and, the fetal calf serum and the UHT milk were chosen as negative controls of the assays. In addition, the ideal optimal dilutions found for blood serum samples was 1:400, for milk samples was 1:10 and for conjugate was 1:10.000 and the substrate used was the ortho-phenylenediamine. The amount of 321 blood serum samples of cows from 15 farms and 47 milk samples of cows from 4 farms were obtained for the application of the standardized indirect ELISA. The prevalence rate found in blood serum samples was 3,1% (10/321) and the prevalence rate found between the corresponding farms studied was 46,7% (7/15), whereas the prevalence rate found in the milk samples was 14,9% (7/47) and the prevalence rate found between the corresponding farms studied was 100% (4/4). The standardization of the indirect ELISA showed satisfactory parameters, therefore it was possible to apply it in blood serum samples and milk samples obtained from cows. It was diagnosed animals already infected with *M. bovis* and the prevalence rate among the farms was more significant than the prevalence rate among the samples tested.

**Keywords:** Bovine. Mycoplasmosis. Immunization. ELISA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1 - Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sangüífero da vaca A diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL, f. 33
- Gráfico 2 - Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sangüífero da vaca A diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 16 µg de antígeno/mL, f. 33
- Gráfico 3 - Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sangüífero da vaca B diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL, f. 33
- Gráfico 4 - Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sangüífero da vaca B diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 16 µg de antígeno/mL, f. 34
- Gráfico 5 - Valores das médias de D.O. das amostras de soro sangüífero, divididas por fazenda, f. 35
- Gráfico 6 - Valores de coeficiente de variação de D.O. das amostras de soro sangüífero, divididos por fazenda, f. 35
- Gráfico 7 - Densidades óticas das amostras de leite UAT e leite da vaca A diluídos 1:5 a 1:160 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL, f. 37
- Gráfico 8 - Densidades óticas das amostras de leite UAT e leite da vaca B diluídos 1:5 a 1:160 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL, f. 38
- Gráfico 9 - Valores das médias de D.O. das amostras de leite, divididas por fazenda, f. 39
- Gráfico 10 - Valores de coeficiente de variação das D.O. das amostras de leite, divididos por fazenda, f. 40

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados das amostras de soro sanguíneo submetidas ao ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*M.bovis*, f. 36

TABELA 2 - Resultados das amostras de leite submetidas ao ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*M.bovis*, f. 39

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
D.O.	Densidade Ótica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
g	Gramma
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
M	Molar
nm	Nanômetro
N	Normal
OFD	Orto-Fenilenodiamina
PESAGRO-RIO	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPLO	“Pleuropneumonia like organism”
®	Marca Registrada
rpm	Rotações por minuto
UAT	Ultra Alta Temperatura
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

**RESUMO**, f. 6

**ABSTRACT**, f. 7

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**, f. 8

**LISTA DE TABELAS**, f. 9

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**, f. 10

1 **INTRODUÇÃO**, f. 14

2 **REVISÃO DE LITERATURA**, f. 16

2.1 CARACTERÍSTICAS DOS MICOPLASMAS E DE *Mycoplasma bovis*, f. 16

2.2 MASTITE CAUSADA POR MICOPLASMAS E SUAS CONSEQUÊNCIAS, f. 17

2.3 ELISA INDIRETO, f. 18

3 **MATERIAL E MÉTODOS**, f. 21

3.1 ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Mycoplasma bovis*, f. 21

3.1.1 **Preparo do imunógeno de *M. bovis***, f. 21

3.1.2 **Imunização de vacas para obtenção de soro sanguíneo e leite hiperimune**, f. 22

3.1.3 **Teste de inibição de crescimento**, f. 22

3.1.4 **Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de soro sanguíneo**, f. 23

3.1.4.1 Determinação da concentração protéica do antígeno, f. 23

3.1.4.2 Sensibilização da fase sólida, f. 23

3.1.4.3 Controles utilizados, f. 24

3.1.4.4 Determinação da diluição ótima dos soros sanguíneos controle e das amostras para teste, f. 24

3.1.4.5 Diluição do conjugado, f. 25

3.1.4.6 Adição do substrato e verificação da absorbância das amostras, f. 25

3.1.4.7 Determinação do limite de discriminação de reatividade das amostras- Ponto de corte, f. 25

- 3.1.5 **Aplicação do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de soro sanguíneo**, f. 25
- 3.1.6 **Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de leite**, f. 27
  - 3.1.6.1 Determinação da concentração protéica do antígeno, f. 27
  - 3.1.6.2 Sensibilização da fase sólida, f. 27
  - 3.1.6.3 Controles utilizados, f. 27
  - 3.1.6.4 Determinação da diluição ótima dos leites controle e das amostras para teste, f. 28
  - 3.1.6.5 Diluição do conjugado, f. 28
  - 3.1.6.6 Adição do substrato e verificação da absorbância das amostras, f. 28
  - 3.1.6.7 Determinação do limite de discriminação de reatividade das amostras– Ponto de corte, f. 28
- 3.1.7 **Aplicação do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de leite**, f. 29
- 3.2 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS, f. 30
- 4 **RESULTADOS**, f. 31
  - 4.1 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO, f. 31
  - 4.2 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- *M. bovis* EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO, f.31
  - 4.3 APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- *M. bovis* EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO, f. 34
  - 4.4 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- *M. bovis* EM AMOSTRAS DE LEITE, f. 36
  - 4.5 APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- *M. bovis* EM AMOSTRAS DE LEITE, f. 38
- 5 **DISCUSSÃO**, f. 41
- 6 **CONCLUSÃO**, f. 43
- 7 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, f. 44
- 8 **ANEXOS**, f. 48

- 8.1 PROTOCOLO PARA PREPARO DO MEIO A, f. 48
  - 8.1.1 **Base**, f. 48
  - 8.1.2 **Solução aditiva**, f. 48
- 8.2 SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA COM FOSFATOS, f. 48
- 8.3 SOLUÇÃO TAMPÃO CARBONATO-BICARBONATO 0,05 M, f. 49
- 8.4 SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO 0,1 M, f. 49
- 8.5 SOLUÇÃO DE FOSFATO DE SÓDIO 0,2 M, f. 49
- 8.6 PREPARO DO SUBSTRATO PARA O ELISA , f. 49
- 8.7 SOLUÇÃO ÁCIDO SULFÚRICO 3N, f. 49

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos: as cadeias produtivas de carne e leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país (BRASIL, 2013a).

O agronegócio do leite e seus derivados desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população. O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo e cresce a uma taxa anual de 4,5%. O leite está entre os quatro primeiros produtos mais importantes da agropecuária brasileira, ficando à frente de produtos tradicionais como o café beneficiado e o arroz (BRASIL, 2009; BRASIL, 2012; BRASIL, 2013b).

O desempenho produtivo de um rebanho de bovinos depende, dentre outros fatores, da eficácia de diversas medidas profiláticas. A preocupação com a sanidade dos bovinos é evidenciada pela existência de vários programas de combate a doenças infecciosas e parasitárias desenvolvidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Entretanto, ainda existem criatórios que não dispõem de um controle sanitário eficaz de seu rebanho, acarretando gastos extras com medicamentos e assistência veterinária, redução da cadeia produtiva, alta morbidade e mortalidade de animais.

A mastite é a inflamação da glândula mamária e está entre as enfermidades de maior importância para o rebanho bovino leiteiro no Brasil.

Pesquisadores internacionais apresentaram resultados indicativos do envolvimento de *Mycoplasma* spp. como agente causador de mastite em bovinos e que esta enfermidade encontra-se frequentemente presente, causando perdas econômicas significativas para os criadores.

No caso da mastite causada por *Mycoplasma bovis* há a característica do aumento de casos clínicos que não respondem à terapêutica, pela gravidade dos sintomas, múltiplos quartos mamários com infecção e redução acentuada na secreção láctea (BUSHNELL<sup>1</sup>, 1984 apud PRETTO et al., 2001).

<sup>1</sup>BUSHNELL, R.B. *Mycoplasma mastitis*. *The Veterinary Clinics of North America*, v. 6, p. 301-312, 1984.



No Brasil, existem poucos estudos sobre mastite bovina causada por *Mycoplasma* spp. e a pesquisa dessa enfermidade está restrita a levantamentos e identificação de surtos esporádicos, sendo possível sugerir que estas infecções estejam subnotificadas. Portanto, diante das perspectivas do Brasil manter a sua posição de destaque no agronegócio do leite, os estudos de identificação de importantes patógenos responsáveis por ocasionar a mastite, como *M. bovis*, é de alta relevância para o país e para a comunidade científica, contribuindo para o controle e tratamento dessa grave enfermidade.

O objetivo do presente trabalho foi padronizar um ELISA indireto, com antígeno celular total de *M. bovis* (cepa Donetta PG 45), para detectar anticorpos anti-*M. bovis* em amostras de soro sanguíneo e leite de vacas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DOS MICOPLASMAS E DE *Mycoplasma bovis*

Os micoplasmas pertencem à classe Mollicutes, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae*. Possuem como características marcantes a ausência de parede celular, necessitam de esteróis e condição de microaerofilia para o seu crescimento e suas colônias apresentam a morfologia de “ovo frito” quando visualizadas com auxílio de microscópio estereoscópio (GOLL, 1994).

Esses microrganismos estão associados a diversas doenças, cujos sinais clínicos podem ser na forma aguda, porém normalmente são de caráter crônico (ROSEBUSCH, 1994). Os micoplasmas são potenciais causadores de patologias no sistema respiratório, urogenital, glândulas mamárias, articulações, sistema nervoso e conjuntiva ocular (KIRKBRIDE, 1987; STIPKOVITS et al., 1993). Segundo Jasper (1994), *M. bovis* é um comprovado patógeno causador de endometrite, salpingite, ooforite e abortos em condições experimentais, mas não é isolado frequentemente do trato urogenital de bovinos. Este microrganismo é isolado ocasionalmente de fetos bovinos abortados e semino-vesiculites, porém é um importante agente causador de artrite, pneumonia e mastite (JASPER, 1994).

Os portadores assintomáticos geralmente são colonizados em superfícies mucosas e são importantes para a disseminação da infecção, servindo como fonte de manutenção do microrganismo na população (WALKER, 2003). *M. bovis* pode ser carregado no trato respiratório de animais assintomáticos, possivelmente servindo como uma fonte para infecções mamárias, além disso, os bezerros que se alimentam de leite contaminado com micoplasmas podem se tornar portadores do microrganismo no trato respiratório, podendo resultar em pneumonia (JASPER, 1994).

Esses microrganismos possuem a capacidade de expressar forte aderência à superfície celular, o que facilita sua sobrevivência e patogenicidade, evitando que sejam totalmente eliminados por secreções fisiológicas (WALKER, 2003).

Micoplasmas são capazes de sobreviver por períodos variáveis de tempo nos tetos das vacas e no ambiente sobrevivem várias semanas em palha, esponjas, estrume e água (JASPER, 1994).

Segundo Mc Auliffe e colaboradores (2006), algumas espécies de micoplasmas são capazes de formar biofilme e, é possível que o modo de crescimento desse biofilme ofereça uma vantagem seletiva a estes microrganismos proporcionando proteção do estresse ambiental, pois mesmo durante a fase estacionária do crescimento bacteriano, quando há escassez de nutrientes, observa-se através de microscopia que até mesmo quando há células bacterianas mortas na superfície do biofilme, existem células bacterianas vivas no centro do biofilme formado. Com relação à *M. bovis*, este microrganismo apresenta resistência à dessecação e essa característica pode ter implicações importantes para a contenção de surtos e para as indústrias de laticínios, pois o mesmo pode persistir no ambiente, assim como em superfícies de equipamentos de indústrias de laticínios, que por ventura utilizem leite mastítico, formando biofilmes (MC AULIFFE et al., 2006).

## 2.2 MASTITE CAUSADA POR MICOPLASMAS E SUAS CONSEQUÊNCIAS

A mastite pode provocar consideráveis prejuízos pela queda de produção láctea decorrente da perda parcial ou até mesmo total da capacidade secretora do úbere, pelo comprometimento das características físico-químicas e microbiológicas do leite e na indústria, a utilização do leite mastítico pode ocasionar problemas tecnológicos como fermentações anormais, demora de coagulação, dificuldade de sinérisis dos queijos, diminuição do rendimento e da termoestabilidade, além do fato deste leite sofrer alteração sensorial e possuir sabor salgado (TRONCO, 2010).

A mastite causada por micoplasmas é agressiva e muitas vezes refratária ao tratamento, além da queda de produção de leite, este pode apresentar um espessamento com perda de fluidez, presença de secreção aquosa que pode progredir para um exsudato purulento e as espécies mais relatadas são *M. bovis*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. alkalescens* e *M. bovigenitalium*, porém, *M. bovis* é a espécie isolada mais frequentemente e que causa a doença mais grave (WALKER, 2003). A mastite causada por *M. bovis* já foi noticiada em muitos países e dentre as espécies de micoplasmas, a referida espécie é relatada como causadora da maioria dos surtos (JASPER, 1994). Em 1961, *M. bovis* foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos a partir de um caso de mastite severa em bovinos. Aparentemente, este patógeno foi se disseminando entre vários países através do trânsito

de animais (NICHOLAS; AYLING, 2003). No Brasil, o primeiro relato de mastite causada por *M. bovis* foi de Mettifogo e colaboradores (1996) na região de Londrina, Estado do Paraná.

A disseminação de *M. bovis* entre os animais é influenciada por práticas de manejo, principalmente a ordenha, embora infecções subclínicas já tenham sido relatadas em vacas, *M. bovis* causa habitualmente mastite clínica grave, com comprometimento de todo úbere associado a um declínio na produção de leite (FILIOUSSIS et al., 2007).

Não existe um tratamento eficaz para a mastite causada por *M. bovis*. Há relatos que cepas de *M. bovis* na Europa já se tornaram resistentes aos antimicrobianos tradicionalmente usados para o tratamento de infecções causadas por micoplasmas, como oxitetraciclinas, tilmicosina e espectinomicina (AYLING et al., 2000). Por conseguinte, o controle da doença depende da identificação de vacas infectadas e subsequente segregação destas (HELLER et al., 1993; FILIOUSSIS et al., 2007), já que as vias de transmissão desse microrganismo são aparentemente simples: Transmissão por contato direto e possivelmente, transmissão por via congênita (PFÜTZNER; SACHSE, 1996). Num estudo de Pretto e colaboradores (2001), a mastite causada por *M. bovis* caracterizou-se pela baixa prevalência (5,83%) entre os animais estudados e a alta prevalência (100%) entre as propriedades estudadas.

A existência de poucos laboratórios especializados no diagnóstico de micoplasmose induz a negligência do envolvimento de micoplasmas como agentes causadores de mastite (NICHOLAS; AYLING, 2003). Considerando que a mastite causada por *M. bovis* é uma patologia muito grave o diagnóstico precoce é de suma importância. A identificação de vacas infectadas por *M. bovis* nos primeiros estágios da mastite pode ser realizada por ELISA indireto para identificação de anticorpos específicos no leite, o que permite identificar o quarto mamário infectado de cada vaca (NICHOLAS; AYLING, 2003).

### 2.3 ELISA INDIRETO

O ELISA é um imunoenensaio bem sensível no qual a especificidade da reação pode ser melhorada aumentando-se o nível de purificação do antígeno ou anticorpo

empregado. O referido método pode ser realizado de forma direta, para detecção de antígenos, ou, indireta, para detecção de anticorpos (TIZARD,1998). Segundo Liberal e Boughton (1994), há boa correlação entre os resultados obtidos no ELISA e em testes de inibição de crescimento. O teste de inibição de crescimento é baseado no fato que um anti-soro específico inibirá o crescimento do micoplasma homólogo. Essa técnica é recomendada para verificar a espécie de micoplasma, mas não é indicada para a quantificação de anticorpos. É o método de escolha para avaliar um anti-soro durante ensaios de imunização (GOLL, 1994). O monitoramento destes ensaios é importante, pois durante um experimento realizado por Byrne e colaboradores (2005), foi evidenciado que podem existir diferenças na produção de anticorpos entre animais que foram inoculados com uma mesma quantidade de microrganismos.

A detecção sorológica de anticorpos contra *M. bovis* é considerada um método de diagnóstico confiável, já que os níveis de anticorpos permanecem elevados por muitos meses (NICHOLAS, 1997). O ELISA possui vantagem frente ao método de cultivo com relação à velocidade e ao potencial para monitorar grandes rebanhos (HELLER et al., 1993). Além disso, a estabilidade de anticorpos no leite de um quarto mamário infectado por *M. bovis* é menos provavelmente afetada por diversos fatores que podem comprometer o método de detecção desse patógeno por cultivo (BYRNE et al., 2000). De acordo com Nicholas (1997), a utilização indiscriminada de antimicrobianos nos rebanhos dificulta o isolamento bacteriano, além do fato do isolamento de *M. bovis* por cultivo ser difícil em bovinos com infecção crônica.

Segundo Byrne e colaboradores (2000), a presença de anticorpos anti- *M. bovis* no leite pode ser devido à resposta imune local decorrente de uma infecção intramamária causada por *M. bovis*, entretanto essa resposta imune também pode ser decorrente de um influxo de imunoglobulinas circulantes no sangue para o úbere de uma vaca que tenha sido infectada por *M. bovis* num local diferente, além disso, a presença de anticorpos específicos também indica que a infecção é invasiva já que em animais nos quais *M. bovis* é encontrado apenas na cavidade nasal, por exemplo, raramente ocorre soroconversão.

Embora uma série de métodos de diagnóstico sorológico, como a

hemaglutinação indireta, já tenham sido relatados, estes quase sempre são substituídos pelo ELISA indireto pelo fato deste método ser considerado mais sensível (NICHOLAS et al., 2000). O ELISA para detecção de anticorpos presentes no leite já foi descrito e, é capaz de identificar individualmente os quartos mamários infectados (BYRNE et al., 2005). Este método tem sido utilizado com sucesso para selecionar bovinos que não estejam infectados por *M. bovis* na Irlanda (O'FARRELL et al., 2001). E, Rashed e El-Shafey (2008) relataram o isolamento de *M. bovis* a partir do cultivo de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica e, obtiveram resultado positivo em 3,17% das 60 amostras coletadas, entretanto através do ELISA indireto houve 17,7% e 52,5 % de resultados positivos a partir de amostras de leite e soro sanguíneo, respectivamente.

O conhecimento do estado sanitário do rebanho pela avaliação sorológica é importante para evitar perdas econômicas e instituir medidas de controle sanitário. Um teste imunológico deve ser capaz de detectar o patógeno independente das características antigênicas da cepa que for responsável pela infecção. A maioria dos antígenos variáveis identificados dentre as cepas de micoplasmas é representada pelas proteínas variantes de superfície e, análises feitas através de Western Blot revelaram que essas proteínas são os antígenos predominantemente reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro durante a infecção por *M. bovis* (BRANK et al., 1999). Não há relatos sobre uma proteína estável, específica, imunogênica e universalmente representativa encontrada dentre as cepas de *M. bovis*, portanto a escolha da cepa para um teste imunológico deve ser bem avaliada. A cepa *M. bovis* Donetta PG45 já foi relatada como uma das cepas que apesar da característica instável, típica das proteínas variantes de superfície comum aos micoplasmas, exhibe atributos antigênicos específicos e representativos para o desenvolvimento de um ELISA (LE GRAND et al., 2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Mycoplasma bovis*

A execução deste trabalho foi autorizada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense, registrado como projeto número 216.

O ELISA foi padronizado, utilizando-se placas para microtitulação (Kartell S.P.A.<sup>®</sup>); Amostras de soro sanguíneo de vacas ou amostras de leite de vacas antes da imunização com imunógeno de *M. bovis*, soro fetal bovino estéril comercial ou leite UAT (Ultra Alta Temperatura) como controles negativos do ensaio; Amostras de soro sanguíneo hiperimune de vacas ou amostras de leite hiperimune de vacas como controles positivos do ensaio; Imunoglobulina G de coelho anti-Imunoglobulina G de bovino conjugada à peroxidase (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e substrato cromogênico Orto-fenilenodiamina (Boehringer Mannheim<sup>®</sup>).

##### 3.1.1 Preparo do imunógeno de *M. bovis*

A cepa de referência de *M. bovis* Donetta PG 45 foi cultivada em meio A (DAVIDSON et al., 1994) líquido e sólido (ANEXO 8.1) e, incubada à temperatura de 37°C sob condição de microaerofilia (TULLY, 1983). Após 48 horas de incubação, os cultivos em meio A sólido foram observados em microscópio estereoscópio para verificação da presença de colônias típicas desse microrganismo (com morfologia semelhante a “ovo frito”). O inóculo em meio A líquido foi cultivado em volumes crescentes deste meio líquido até atingir o volume de 1 litro de cultura de *M. bovis* e, o crescimento de colônias típicas de *M. bovis* foi confirmado através de cultivos em meio A sólido realizados concomitantemente.

Após o período de cultivo, o volume de 1 litro de cultura de *M. bovis* foi inativado com 4 mL de formaldeído P.A. e colocado em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C por 3 dias, executando-se homogeneização diária da cultura.

A cultura foi centrifugada e a massa celular obtida foi lavada com solução salina tamponada com fosfatos (ANEXO 8.2) por 3 vezes. A massa celular foi ressuspensa em solução salina tamponada com fosfatos na proporção 1:4 e,

submetida à teste para verificação da inativação da cepa através do cultivo em meio A sólido por 48 horas. Essa massa celular obtida também foi submetida à verificação da concentração proteica, conforme Lowry et al. (1951), para determinar a concentração de antígeno que seria inoculada nos animais em etapa posterior.

### **3.1.2 Imunização de vacas para obtenção de soro sanguíneo e leite hiperimune**

O protocolo utilizado para imunização dos animais foi baseado em relatos de Chima e colaboradores (1981), Howard e colaboradores (1982) e Araújo e colaboradores (2003).

O procedimento para obtenção de soro sanguíneo hiperimune e leite hiperimune foi iniciado com a imunização de 2 vacas, que foram nomeadas de vaca A e vaca B (recém paridas e sem histórico clínico de enfermidades causadas por micoplasmas), através da inoculação por via subcutânea do imunógeno de *M. bovis* emulsionado com adjuvante incompleto de Freund, conforme recomendações de Howard e colaboradores (1982). Para a imunização de cada animal, foram emulsionados o volume de 2 mL de antígeno *M. bovis* (contendo 5 mg de proteína) com 2 mL de adjuvante incompleto de Freund, perfazendo a quantidade de 4 mL. As coletas de sangue e leite dos animais foram realizadas antes da imunização (para verificação prévia da condição imunológica de cada animal) e nos intervalos de 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização (para obtenção do soro sanguíneo e leite hiperimune). Amostras de soro sanguíneo e amostras de leite resultantes de cada coleta foram submetidas ao teste de inibição de crescimento e ao ELISA para avaliação da produção de anticorpos contra *M. bovis*.

### **3.1.3 Teste de inibição de crescimento**

Para execução do teste foram utilizados discos de papel filtro impregnado com soro sanguíneo ou leite, inóculo de *M. bovis* em meio A líquido e meio A sólido. O resultado do teste foi dado pela presença ou ausência de zona de inibição de



crescimento de colônias de micoplasma ao redor do disco de papel filtro impregnado com anti-soro específico.

As seguintes amostras foram submetidas ao teste: amostra de soro fetal bovino estéril, amostras de soro sanguíneo (extraídas após centrifugação a 1000 rpm por 15 minutos, das amostras de sangue coletadas) coletadas antes da imunização e nos intervalos de 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização das vacas, amostra de leite UAT, amostras de leite (após centrifugação a 2000 rpm por 60 minutos para retirada da gordura) coletadas antes da imunização e nos intervalos de 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização das vacas.

#### **3.1.4 Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de soro sanguíneo**

Os procedimentos adotados são baseados em relatos de elaboração de ELISA para detecção indireta de micoplasmas causadores de enfermidades em animais, descritos por Cassell e Brown (1983), Liberal e Boughton (1992), Nicolet e Martel (1996) e Campos e colaboradores (2000).

##### **3.1.4.1 Determinação da concentração protéica do antígeno**

A cepa de referência *M. bovis* Donetta PG 45 foi cultivada em meio A, para obtenção do antígeno a ser utilizado na etapa de sensibilização das placas de microtitulação. A concentração protéica do antígeno *M. bovis* foi mensurada pelo método de Lowry et al. (1951).

##### **3.1.4.2 Sensibilização da fase sólida**

As placas de microtitulação foram sensibilizadas inicialmente com 50  $\mu$ L (por poço) de antígeno celular total de *M. bovis* contendo as seguintes concentrações proteicas: 2  $\mu$ g de antígeno/mL, 4  $\mu$ g de antígeno/mL, 8  $\mu$ g de antígeno/mL e 16  $\mu$ g de antígeno/mL. Entretanto para efeito de interface, após análises estatísticas dos resultados, optou-se pela continuidade dos ensaios com a sensibilização das placas de microtitulação com 50  $\mu$ L (por poço) de antígeno celular total de *M. bovis*

contendo as concentrações proteicas de 2 µg de antígeno/mL e 16 µg de antígeno/mL. As diferentes concentrações proteicas foram obtidas através da diluição do antígeno celular total em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (ANEXO 8.3). Estas placas de microtitulação foram incubadas a 4°C “overnight”. Após este período, as referidas placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos adicionada de 0,05% de monolaurato de polioxietileno sorbitano-Tween<sup>®</sup> 20 (50 µL por poço), por três vezes.

#### 3.1.4.3 Controles utilizados

Foram utilizados soros sanguíneos hiperimunes produzidos nas vacas A e B, como controles positivos do ensaio, soro fetal bovino estéril comercial e amostras de soro sanguíneo das vacas A e B antes da imunização, como controles negativos do ensaio, Imunoglobulina G de coelho anti-Imunoglobulina G de bovino conjugada à peroxidase (conjugado) e substrato cromogênico Orto-fenilenediamina (OFD). Em todos os ensaios também foram incluídos o controle do substrato (poço da placa de microtitulação em que foi colocado somente o antígeno e o substrato), o controle do conjugado (poço da placa de microtitulação em que foi colocado somente o antígeno, conjugado e substrato) e todos os valores foram obtidos em duplicata, para avaliação da repetibilidade do ensaio.

#### 3.1.4.4 Determinação da diluição ótima dos soros sanguíneos controle e das amostras para teste

As amostras de soro sanguíneo das vacas A e B, animais controle, antes da imunização (para verificação prévia da condição imunológica de cada animal e controle negativo), as amostras de soro sanguíneo das vacas A e B coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização (controles positivos) e a amostra de soro fetal bovino estéril comercial (controle negativo) foram diluídos na base 2, com diluições de 1:100 a 1:3.200 (Campos et al., 2000), em solução salina tamponada com fosfatos nas placas de microtitulação. Após a incubação das placas em estufa à temperatura de 37°C pelo período de 2 horas, estas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos adicionada de 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (50 µL por poço), por três vezes, para a realização da etapa seguinte.

#### 3.1.4.5 Diluição do conjugado

A diluição do conjugado utilizada foi 1:10.000 em solução salina tamponada com fosfatos. Esta etapa foi realizada com a adição de 50  $\mu$ L do conjugado diluído em cada poço da placa de microtitulação. Em seguida, as placas de microtitulação foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C por uma hora e, foram lavadas como já descrito anteriormente.

#### 3.1.4.6 Adição do substrato e verificação da absorbância das amostras

O substrato cromogênico OFD foi diluído numa solução tampão preparada imediatamente antes do uso (ANEXOS 8.4, 8.5 e 8.6). O volume de 50  $\mu$ L do substrato foi adicionado em cada poço das placas de microtitulação, as quais foram incubadas à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 3 N (ANEXO 8.7), por poço, e as absorbâncias foram verificadas em espectrofotômetro (DNM-9602 microplate reader<sup>®</sup>) com filtro de 492 nm.

#### 3.1.4.7 Determinação do limite de discriminação de reatividade das amostras- Ponto de corte

Para a determinação do limite de discriminação de reatividade das amostras (ponto de corte) foi considerada como base a média dos valores de absorbância dos soros sanguíneos negativos (amostra de soro fetal bovino estéril comercial e amostras de soro sanguíneo das vacas A e B antes da imunização), a qual foi multiplicada por 2,5 para estabelecimento do ponto de corte (ONOVIRAN; ROBINSON, 1979; CASSELL; GAMBILL; DUFFY, 1996).

#### 3.1.5 **Aplicação do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de soro sanguíneo**

Após a padronização do ELISA, 321 amostras de soro sanguíneo de vacas com idade superior a 24 meses e oriundas de 15 propriedades do município de Carmo, Estado do Rio de Janeiro, foram submetidas ao ensaio. Estas amostras pertenciam ao banco de soro do Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal

Geraldo Manhães Carneiro pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) e, foram gentilmente cedidas pela pesquisadora Leda Maria Silva Kimura para serem testadas neste trabalho. As referidas amostras foram coletadas nos anos de 2010 e 2011 para serem submetidas ao diagnóstico de brucelose, no qual se obteve resultado negativo.

Como controle positivo do ensaio foi utilizado uma amostra de soro sanguíneo hiperimune da vaca A, coletado 30 dias após a imunização descrita na seção 3.1.2 e, como controle negativo do ensaio foi utilizado soro fetal bovino estéril comercial. Em todos os ensaios também foram incluídos o controle do substrato, o controle do conjugado e todos os valores foram obtidos em duplicata, para avaliação da repetibilidade do ensaio.

As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L (por poço) de antígeno celular total de *M. bovis*, com a concentração de 2  $\mu$ g antígeno/mL diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Estas placas de microtitulação foram incubadas a 4°C “overnight”. Após este período, as referidas placas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos adicionada de 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (50  $\mu$ L por poço), por três vezes.

As amostras de soro sanguíneo foram diluídas na proporção de 1:400 em solução salina tamponada com fosfatos nas placas de microtitulação. Após a incubação das placas em estufa à temperatura de 37°C pelo período de duas horas, estas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos adicionado de 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (50  $\mu$ L por poço), para a realização da próxima etapa do ensaio: a adição do conjugado.

A diluição do conjugado utilizada foi 1:10.000 em solução salina tamponada com fosfatos. Essa etapa foi realizada com a adição de 50  $\mu$ L do conjugado diluído, em cada poço da placa de microtitulação. Em seguida, as placas de microtitulação foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C, por 1 hora, e foram lavadas como já descrito anteriormente.

O substrato cromogênico OFD foi diluído numa solução tampão preparada imediatamente antes do uso (ANEXOS 8.4, 8.5 e 8.6). O volume de 50  $\mu$ L do substrato foi adicionado em cada poço das placas de microtitulação, as quais foram

incubadas à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 3 N (ANEXO 8.7), por poço, e as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (DNM-9602 microplate reader<sup>®</sup>) com filtro de 492 nm.

### **3.1.6 Padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de leite**

Os procedimentos adotados são baseados em relatos de elaboração de ELISA indireto descritos por Cassell e Brown (1983), Nicolet e Martel (1996), além de modificações feitas a partir da etapa de padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de soro sanguíneo.

#### **3.1.6.1 Determinação da concentração protéica do antígeno**

Foi realizado o mesmo procedimento descrito na seção 3.1.4.2.

#### **3.1.6.2 Sensibilização da fase sólida**

As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 50  $\mu\text{L}$  (por poço) de antígeno celular total de *M. bovis* com a concentração protéica de 2  $\mu\text{g}$  de antígeno/mL. A concentração proteica foi obtida através da diluição do antígeno celular total em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (ANEXO 8.3). Essas placas de microtitulação foram incubadas a 4°C “overnight”. Após este período, as referidas placas foram lavadas por 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos adicionada de 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (50  $\mu\text{L}$  por poço).

#### **3.1.6.3 Controles utilizados**

Foram utilizadas as amostras de leite hiperimune coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização das vacas A e B, como controles positivos do ensaio. E amostra de leite UAT e as amostras de leite das vacas A e B coletadas antes da imunização, como controles negativos do ensaio. Em todos os ensaios também foram incluídos o controle do substrato (poço da placa de microtitulação em que foi colocado somente o antígeno e o substrato), o controle do conjugado (poço da placa

de microtitulação em que foi colocado somente o antígeno, conjugado e substrato) e todos os valores foram obtidos em duplicata, para avaliação da repetibilidade do ensaio.

#### 3.1.6.4 Determinação da diluição ótima dos leites controle e das amostras para teste

As amostras de leite das vacas A e B, animais controle, antes da imunização (para verificação prévia da condição imunológica de cada animal e controle negativo), as amostras de leite das vacas A e B coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização (controles positivos) e o leite UAT (controle negativo) foram diluídos na base 2, com diluições de 1:5 a 1:160 (Nicolet; Martel, 1996), em solução salina tamponada com fosfatos nas placas de microtitulação. Após a incubação das placas de microtitulação em estufa à temperatura de 37°C pelo período de 2 horas, estas foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfatos adicionada de 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (50 µL por poço), para a realização da etapa seguinte: a adição do conjugado.

#### 3.1.6.5 Diluição do conjugado

Foi realizado o mesmo procedimento descrito na seção 3.1.4.5.

#### 3.1.6.6 Adição do substrato e verificação da absorbância das amostras

Foi realizado o mesmo procedimento descrito na seção 3.1.4.6.

#### 3.1.6.7 Determinação do limite de discriminação de reatividade das amostras– Ponto de corte

Para a determinação do limite de discriminação de reatividade das amostras (ponto de corte) foi considerada como base a média dos valores de absorbância das amostras de leite negativas (amostra de leite UAT e amostras de leite das vacas A e B antes da imunização), a qual foi multiplicada por 2,5 para estabelecimento do ponto de corte (ONOVIRAN; ROBINSON, 1979; CASSELL; GAMBILL; DUFFY, 1996).

### 3.1.7 Aplicação do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de leite

Após a padronização do ELISA, as 47 amostras de leite de vacas, com idade superior a 36 meses, oriundas de 4 propriedades leiteiras localizadas no município de Tanguá, Estado do Rio de Janeiro, foram submetidas ao ensaio. As amostras foram coletadas aleatoriamente entre os meses de dezembro do ano 2012 e janeiro do ano 2013, sendo 17 amostras de leite em uma propriedade e 10 amostras de leite em cada uma das demais propriedades. Do número total de animais, 10 vacas apresentavam histórico clínico de mastite.

Como controle positivo do ensaio foi utilizada a amostra de leite hiperimune de vaca A, coletada 30 dias após a imunização descrita na seção 3.1.2 e, como controle negativo do ensaio foi utilizado o leite UAT. Em todos os ensaios também foram incluídos o controle do substrato, o controle do conjugado e todos os valores foram obtidos em duplicata, para avaliação da repetibilidade do ensaio.

As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L (por poço) de antígeno celular total com a concentração de 2  $\mu$ g antígeno/mL de *M. bovis* diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6). Essas placas para microtitulação foram incubadas a 4°C “overnight”. Após este período, as referidas placas foram lavadas por três vezes com solução salina tamponada com fosfato, adicionada de 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (50  $\mu$ L por poço).

As amostras de leite foram centrifugadas a 2.000 rpm por 1 hora para que fosse realizado o desnate do leite a fim de facilitar a diluição destas. Estas amostras foram diluídas na proporção de 1:10 em solução salina tamponada com fosfatos nas placas de microtitulação. Após a incubação das placas em estufa à temperatura de 37°C pelo período de 2 horas, estas foram lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfatos adicionada de 0,05% de Tween<sup>®</sup> 20 (50  $\mu$ L por poço), para a realização da próxima etapa do ensaio que é a adição do conjugado.

A diluição de conjugado utilizada foi 1:10.000 em solução salina tamponada com fosfatos. Essa etapa foi realizada com a adição de 50  $\mu$ L do conjugado diluído, em cada poço da placa de microtitulação. Em seguida, as placas de microtitulação foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C, por uma hora, e foram lavadas como já descrito anteriormente.

O substrato cromogênico OFD foi diluído numa solução tampão preparada imediatamente antes do uso (ANEXOS 8.4, 8.5 e 8.6). O volume de 50  $\mu\text{L}$  do substrato foi adicionado em cada poço das placas de microtitulação, as quais foram incubadas à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  (por poço), de ácido sulfúrico 3 N (ANEXO 8.7) e as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (DNM-9602 microplate reader<sup>®</sup>) com filtro de 492 nm.

### 3.2 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

No presente trabalho foram utilizadas as seguintes análises estatísticas para avaliar os resultados obtidos (SAMPAIO, 2002):

- O teste t de Student foi utilizado durante a padronização do ELISA para avaliar a significância estatística dos valores de Densidade Ótica (D.O.) obtidos das amostras que seriam consideradas como controles negativos, das amostras coletadas das vacas A e B assim como para determinar a concentração de antígeno que seria usada para sensibilizar as placas de microtitulação;
- Cálculos de média e coeficiente de variação para estimar variações das D.O. obtidas das amostras testadas;
- O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para analisar a frequência de amostras positivas e a frequência de amostras negativas entre as fazendas estudadas.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

Não foi observada zona de inibição de crescimento de colônias de *M. bovis* (cepa Donetta PG 45) em torno dos discos de papel impregnados com amostra de soro fetal bovino estéril comercial ou leite UAT, nem com as amostras de soro sanguíneo ou leite, coletadas das vacas antes da imunização. Enquanto em torno dos discos de papel impregnados com as amostras de soro sanguíneo ou leite, coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização das vacas, foi possível observar zona de inibição de crescimento de colônias de *M. bovis*.

A ausência de zona de inibição de crescimento de colônias de *M. bovis* nos testes de inibição de crescimento das amostras de soro fetal bovino estéril comercial, leite UAT e de soros sanguíneos e leites coletados das vacas antes da imunização indica a ausência de anticorpos anti- *M. bovis* nestas amostras. Essa ausência de anticorpos anti- *M. bovis* nas amostras de soro fetal bovino estéril comercial e leite UAT motivou a submissão destas amostras ao ELISA para que fosse também verificada a D.O..

A presença de zona de inibição de crescimento de colônias de *M. bovis* nos testes de inibição de crescimento das amostras de soro sanguíneo e leite coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização das vacas indica a presença de anticorpos anti- *M. bovis* nestas amostras. Essa presença de anticorpos anti- *M. bovis* nas amostras de soro sanguíneo e leite coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização das vacas motivou a submissão destas amostras ao ELISA para que fosse verificada qual amostra apresentaria a maior D.O. (Howard et al., 1982), indicando maior número de anticorpos presentes, para ser usada como controle positivo do ELISA.

### 4.2 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- *M. bovis* EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO

Durante a padronização deste ELISA indireto, a D.O. dos soros sanguíneos, controles positivos e controles negativos, em placas de microtitulação sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL e 16 µg de antígeno/mL não diferiu notavelmente (Gráficos 1, 2, 3 e 4). O aumento da concentração de antígeno não implicou em aumento da

reação antígeno-anticorpo com conseqüente aumento da D.O.. Foi constatado através do teste t de Student que não havia diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os valores de D.O. das amostras de soro sanguíneo testadas nas concentrações de antígeno mencionadas, portanto optou-se por utilizar a menor concentração de antígeno ( $2 \mu\text{g/mL}$ ). A diferença de D.O. dentre as amostras de soro sanguíneo foi observada apenas entre as diferentes diluições utilizadas, 1:100 a 1:3.200, (Gráficos 1, 2, 3 e 4). Nas placas sensibilizadas com  $2 \mu\text{g}$  de antígeno/mL, a amostra de soro fetal bovino estéril comercial apresentou as menores D.O. observadas dentre as diluições das amostras testadas. Tomando como exemplo os extremos, na diluição 1:100 a D.O. do soro fetal bovino estéril comercial foi 0,084 e na diluição 1:3.200 a D.O. foi 0,053. Portanto, foi verificado que a amostra de soro fetal bovino estéril comercial apresentava baixa D.O. (próxima ao valor zero), em concordância com a boa relação com o teste de inibição de crescimento descrita por Liberal e Boughton (1994), e indicando que esta amostra seria o controle negativo ideal dos ensaios que seriam executados.

Foram observadas diferenças entre as D.O. das diferentes amostras de soro sanguíneo demonstrando que ocorreu uma progressão da produção de anticorpos nas vacas imunizadas até 30 dias após a imunização e uma queda da produção de anticorpos aos 60 dias após a imunização. A amostra de soro sanguíneo da vaca A obtida 30 dias após a imunização apresentou as maiores D.O. observadas dentre as diluições das amostras testadas (Gráfico 1). Tomando como exemplo os extremos, na diluição 1:100 a D.O. do soro sanguíneo da vaca A obtida 30 dias após a inoculação do imunógeno de *M. bovis* foi 0,380 e na diluição 1:3.200 foi 0,123.

A diluição considerada ideal para as amostras de soro sanguíneo foi a diluição de 1:400 porque esta foi a maior diluição em que foi observado que a amostra de soro sanguíneo da vaca A obtida 30 dias após a imunização apresentava D.O. (0,267) com valor acima de 0,2 (Howard et al., 1982). O valor 0,2 foi determinado como ponto de corte por ser 2,5 vezes a média das D.O. das amostras de soro sanguíneo consideradas como negativas. O ponto de corte indica que as amostras testadas com valor de D.O. acima de 0,2 seriam consideradas resultado positivo/presença de anticorpos anti-*M. bovis*, enquanto as amostras de soro sanguíneo testadas com valor de D.O. abaixo de 0,2 seriam consideradas resultado negativo/ausência de anticorpos anti-*M. bovis*.

Com relação aos controles do conjugado e o controle do substrato utilizados nos ensaios, o valor de D.O. encontrado foi aproximadamente 0,06 em ambos, durante a execução de todos os ensaios.

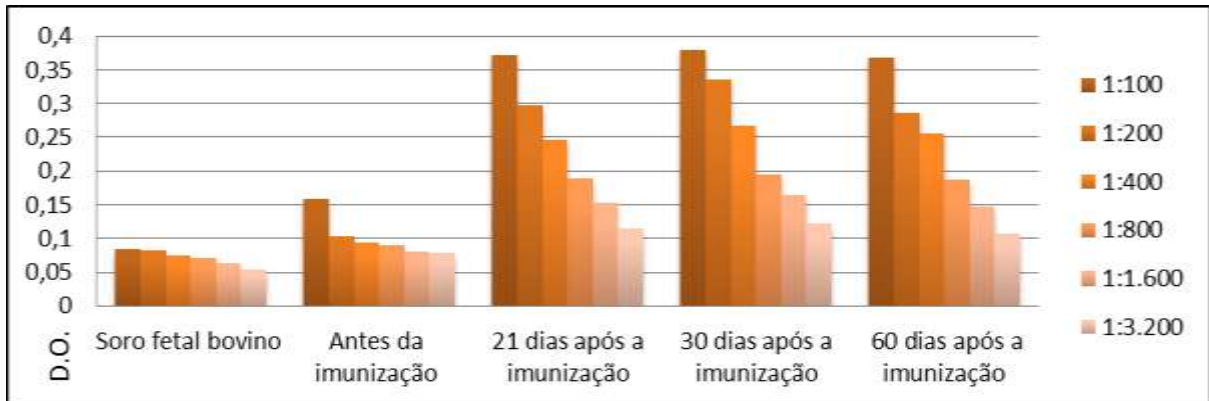


Gráfico 1 Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo da vaca A diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfatos em placas sensibilizadas com 2  $\mu$ g de antígeno/mL.

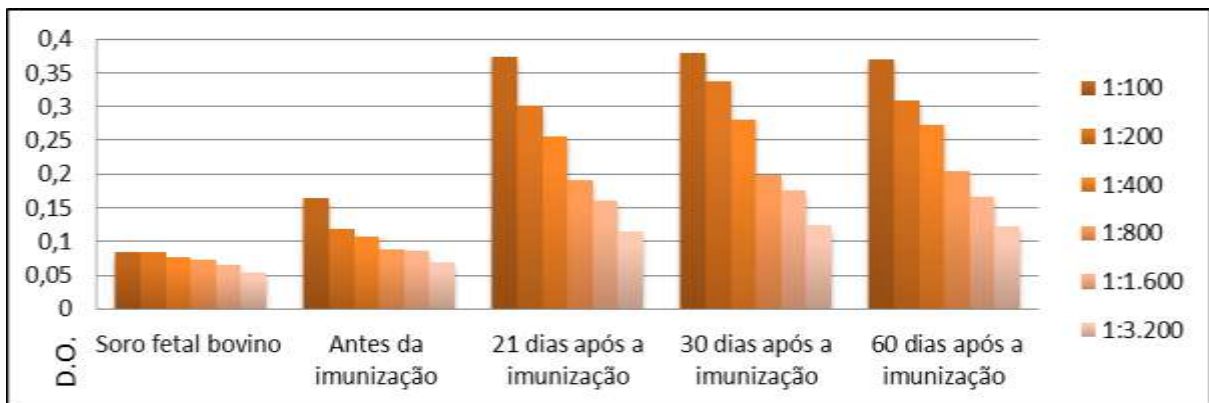


Gráfico 2 Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo da vaca A diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfatos em placas sensibilizadas com 16  $\mu$ g de antígeno/mL.

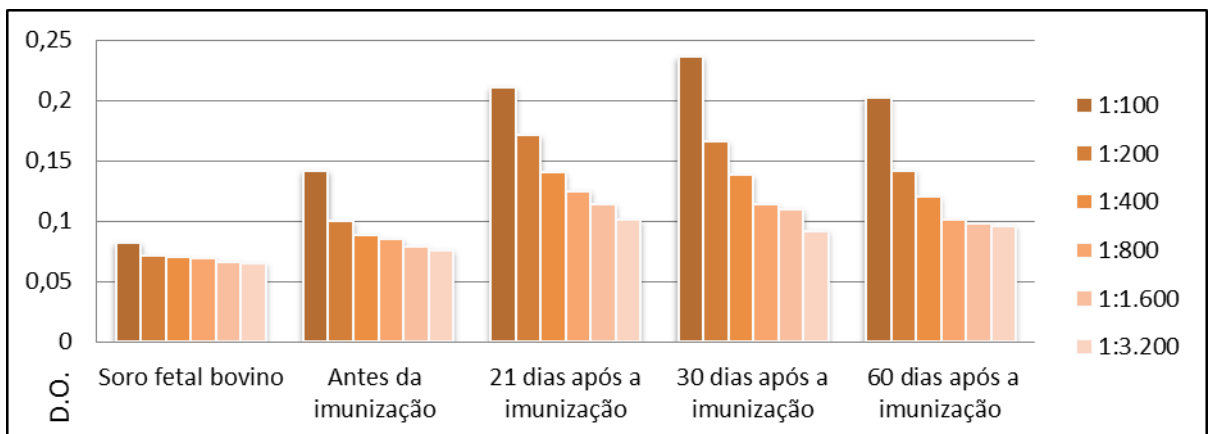


Gráfico 3 Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo da vaca B diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfatos em placas sensibilizadas com 2  $\mu$ g de antígeno/mL.

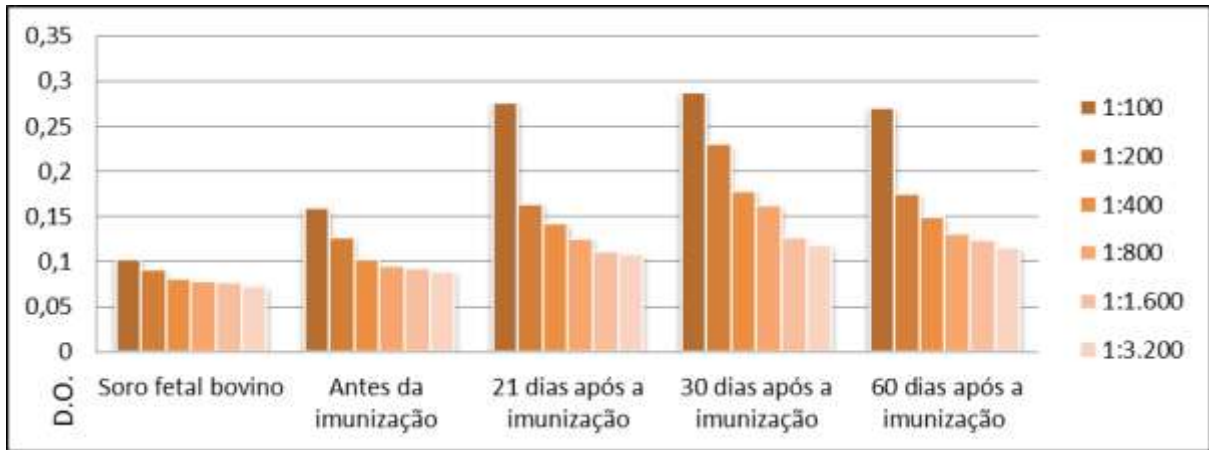


Gráfico 4 Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo da vaca B diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfatos em placas sensibilizadas com 16 µg de antígeno/mL.

Não houve necessidade de realizar mais uma etapa usando uma substância de bloqueio antes da etapa de adição das amostras nas placas para microtitulação, assim como Liberal e Boughton (1992), nem houve necessidade de aumentar a diluição do conjugado porque não foram observadas reações inespecíficas nos controles do substrato e do conjugado. A diluição do conjugado e o substrato utilizado foram adequados para os ensaios, em concordância com resultados obtidos por Campos e colaboradores (2000). Os controles do substrato e do conjugado foram utilizados em todos os ensaios e não apresentaram reação tanto visualmente quanto na verificação da D.O. após ser realizada a leitura das placas do ELISA em espectrofotômetro, de acordo com recomendações de Cassell e Brown (1983).

#### 4.3 APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*M. bovis* EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO

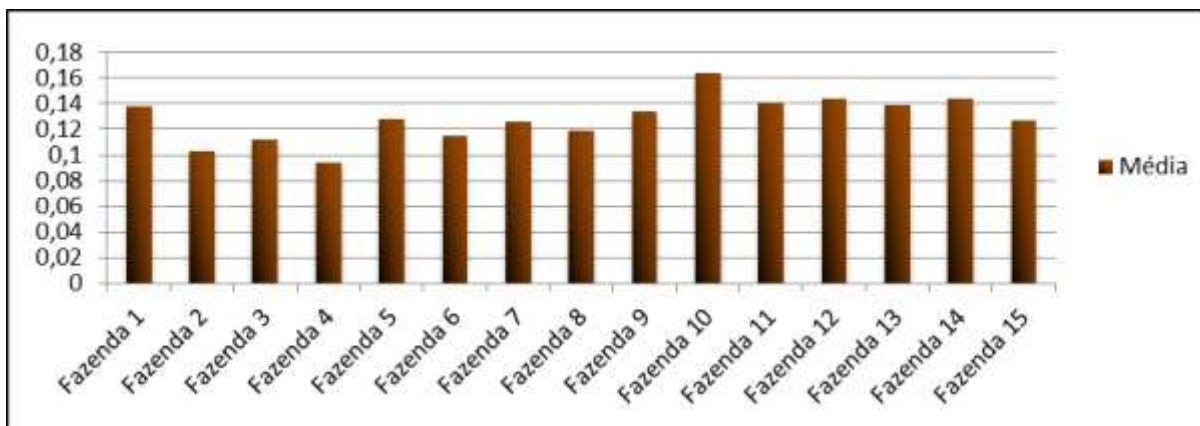
Do total de 321 amostras submetidas ao ELISA, 10 amostras resultaram positivas e 311 amostras resultaram negativas, portanto a prevalência encontrada dentre os animais foi de 3,1% (10/321). As amostras positivas foram encontradas em 7 fazendas, resultando numa prevalência de 46,7% (7/15) dentre as fazendas. Na tabela 1, estão expostos os resultados das amostras submetidas ao ELISA.

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, não foi evidenciada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) na análise da frequência de amostras positivas entre as

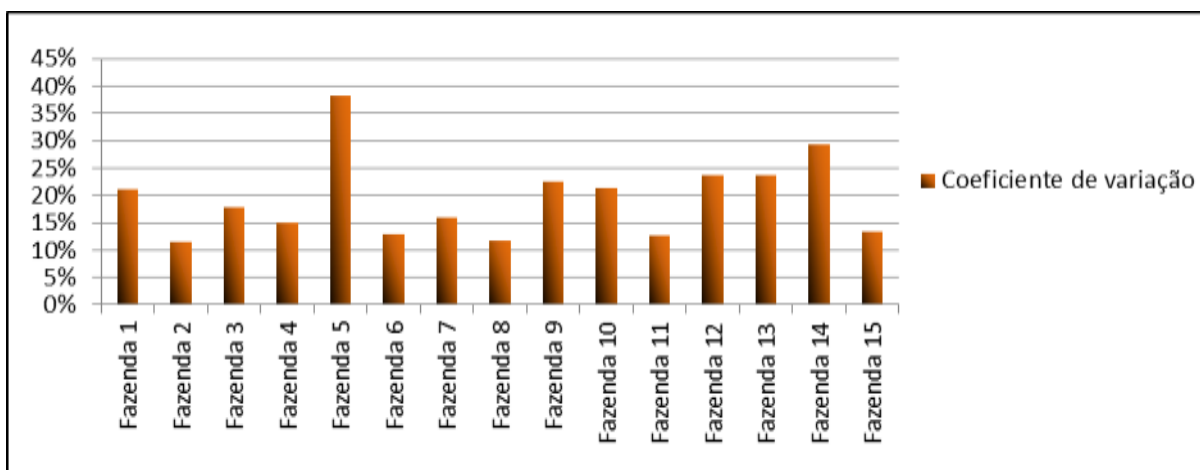
fazendas estudadas, entretanto foi evidenciada uma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na análise da frequência de amostras negativas entre as fazendas estudadas.

Para avaliar a variação da resposta imunológica, dentre os animais de cada fazenda, foram calculados a média e o coeficiente de variação de D.O. das amostras de soro sanguíneo de cada fazenda. Nos gráficos 5 e 6 estão expostos os resultados obtidos. Dentre o total de animais testados, a média de D.O. foi 0,128 e o coeficiente de variação foi de 25,8 %.

Com o objetivo de monitorar os valores de D.O. dos controles positivos e dos controles negativos utilizados durante o período de execução dos ensaios, foi calculado o coeficiente de variação após o término da execução destes. O valor obtido do coeficiente de variação para o controle positivo foi 7% e, o valor obtido do coeficiente de variação para o controle negativo foi 4,5%.



**Gráfico 5** Valores das médias de D.O. das amostras de soro sanguíneo, divididas por fazenda.



**Gráfico 6** Valores de coeficiente de variação de D.O. das amostras de soro sanguíneo, divididas por fazenda.

**TABELA 1** Resultados das amostras de soro sanguíneo submetidas ao ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*M.bovis*.

	<b>Amostras positivas*</b>	<b>Amostras negativas**</b>	<b>Total</b>
Fazenda 1	1	15	16
Fazenda 2	0	35	35
Fazenda 3	0	22	22
Fazenda 4	0	13	13
Fazenda 5	1	19	20
Fazenda 6	0	20	20
Fazenda 7	0	14	14
Fazenda 8	0	15	15
Fazenda 9	1	25	26
Fazenda 10	3	14	17
Fazenda 11	0	10	10
Fazenda 12	1	27	28
Fazenda 13	2	24	26
Fazenda 14	1	25	26
Fazenda 15	0	33	33
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>311</b>	<b>321</b>

\* Teste de Kruskal-Wallis, ( $p>0,05$ )/ \*\*Teste de Kruskal-Wallis, ( $p<0,05$ )

#### 4.4 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- *M. bovis* EM AMOSTRAS DE LEITE

Na padronização deste ELISA indireto as amostras de leite, controles positivos e controles negativos, foram testadas em placas de microtitulação sensibilizadas com 2  $\mu\text{g}$  de antígeno/ml assim como descrito na seção 4.2, porque já havia sido constatado que o aumento da concentração de antígeno não implicava em aumento da reação antígeno-anticorpo com conseqüente aumento da D.O. ( $p>0,05$ ). A amostra de leite UAT apresentou as menores D.O. observadas dentre as diluições das amostras testadas (Gráficos 7 e 8). Tomando como exemplo os extremos, na diluição 1:5 a D.O. do leite UAT foi 0,087 e na diluição 1:160 a D.O. foi 0,055. Portanto, foi verificado que a amostra de leite UAT apresentava baixa D.O. (próxima ao valor zero), em concordância com a boa relação com o teste de inibição de crescimento descrita por Liberal e Boughton (1994), e indicando que esta amostra seria o controle negativo ideal dos ensaios que seriam executados.

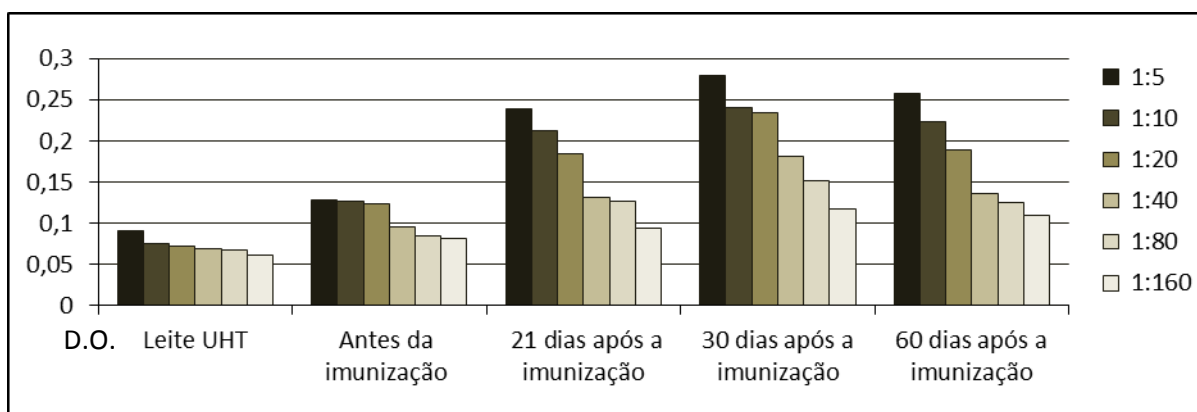
Foi observada diferença na produção de anticorpos entre as vacas A e B. As amostras de leite da vaca A submetidas ao ELISA apresentaram progressão da produção de anticorpos até 30 dias após a imunização e queda da produção de anticorpos aos 60 dias após a imunização, evidenciada também nas amostras de

soro sanguíneo desta, porém as amostras de leite testadas da vaca B apresentaram progressão na produção de anticorpos até os 21 dias após a imunização e uma queda na produção de anticorpos aos 60 dias após a imunização. A amostra de leite da vaca A obtida 30 dias após a imunização apresentou as maiores D.O. observadas dentre as diluições das amostras testadas (Gráfico 7). Tomando como exemplo os extremos, na diluição 1:5 a D.O. do leite da vaca A obtida 30 dias após a imunização foi 0,279 e na diluição 1:160 a D.O. foi 0,117.

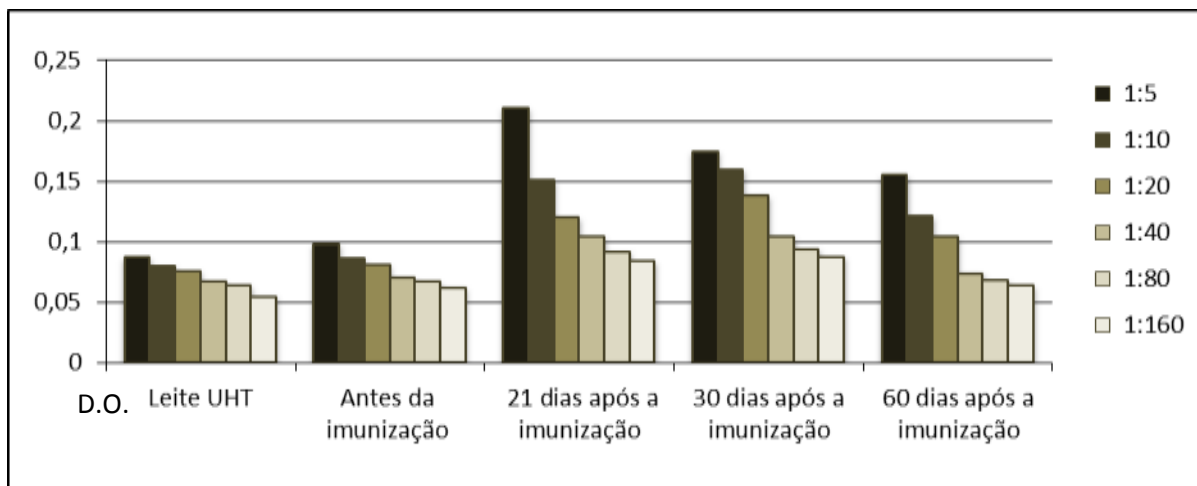
A diferença de D.O. dentre as amostras de leite foi observada apenas entre as diferentes diluições utilizadas, 1:5 a 1:160, (Gráficos 7 e 8). A diluição considerada ideal para as amostras de leite foi a diluição de 1:10 porque esta foi a maior diluição em que foi observado que as amostras de leite da vaca A obtidas 21 e 30 dias após a imunização apresentavam valor de D.O. (0,213 e 0,240, respectivamente) acima de 0,2 (Howard et al., 1982).

O valor 0,2 foi determinado como ponto de corte por ser 2,5 vezes a média das D.O. das amostras de leite consideradas como negativas. Esse ponto de corte indica que as amostras de leite que apresentassem D.O. com valor acima de 0,2 seriam consideradas resultado positivo/presença de anticorpos anti-*M. bovis*, enquanto as amostras de leite testadas que apresentassem D.O. com valor abaixo de 0,2 seriam consideradas resultado negativo/ausência de anticorpos anti-*M. bovis*.

Com relação aos controles do conjugado e o controle do substrato utilizados nos ensaios, o valor de D.O. encontrado foi aproximadamente 0,06 em ambos, durante a execução de todos os ensaios.



**Gráfico 7** Densidades óticas das amostras de leite UAT e leite da vaca A diluídos 1:5 a 1:160 em solução salina tamponada com fosfatos em placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL.



**Gráfico 8** Densidades óticas das amostras de leite UAT e leite da vaca B diluídos 1:5 a 1:160 em solução salina tamponada com fosfatos em placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL.

Assim como durante a padronização do ELISA indireto com amostras de soro sanguíneo, não houve necessidade de realizar mais uma etapa usando uma substância de bloqueio antes da etapa de adição das amostras nas placas para microtitulação, assim como Liberal e Boughton (1992), nem houve necessidade de aumentar a diluição do conjugado porque não foram observadas reações inespecíficas nos controles do substrato e do conjugado. A diluição do conjugado e o substrato utilizados foram adequados para os ensaios, em concordância com resultados obtidos por Campos e colaboradores (2000). Os controles do substrato e do conjugado foram utilizados em todos os ensaios e não apresentaram reação tanto visualmente quanto na verificação da D.O. após ser realizada a leitura das placas do ELISA em espectrofotômetro, de acordo com recomendações de Cassell e Brown (1983).

#### 4.5 APLICAÇÃO DO ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*M. bovis* EM AMOSTRAS DE LEITE

Do total de 47 amostras submetidas ao ELISA, 7 amostras resultaram positivas e 40 amostras resultaram negativas, portanto a prevalência encontrada dentre os animais foi de 14,9% (7/47). As amostras positivas foram encontradas nas 4 fazendas, resultando numa prevalência de 100% (4/4) dentre as fazendas. Dentre as 7 amostras positivas, apenas um animal (D.O. da amostra de leite: 0,214) tinha histórico clínico de mastite. Na tabela 2, estão expostos os resultados das 47 amostras de leite submetidas ao ELISA.



O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para analisar a frequência de amostras positivas e a frequência de amostras negativas dentre as fazendas estudadas e, não foi evidenciada diferença estatística ( $p>0,05$ ).

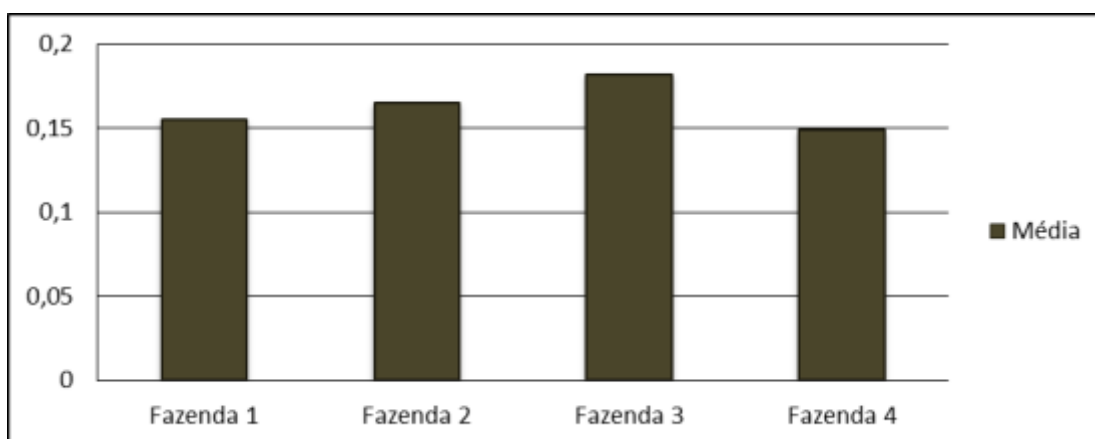
Para avaliar a variação da resposta imunológica, dentre os animais de cada fazenda, foram calculados a média e o coeficiente de variação de D.O. das amostras de leite de cada fazenda. Nos gráficos 9 e 10 estão expostos os resultados obtidos. Dentre o total de animais testados, a média de D.O. foi 0,163 e o coeficiente de variação foi de 19,6%.

Com o objetivo de monitorar os valores de D.O. dos controles positivos e os controles negativos utilizados durante o período de execução dos ensaios, foi calculado o coeficiente de variação após o término da execução destes. O valor obtido do coeficiente de variação para o controle positivo foi 6,8% e, o valor obtido do coeficiente de variação para o controle negativo foi 1,4%.

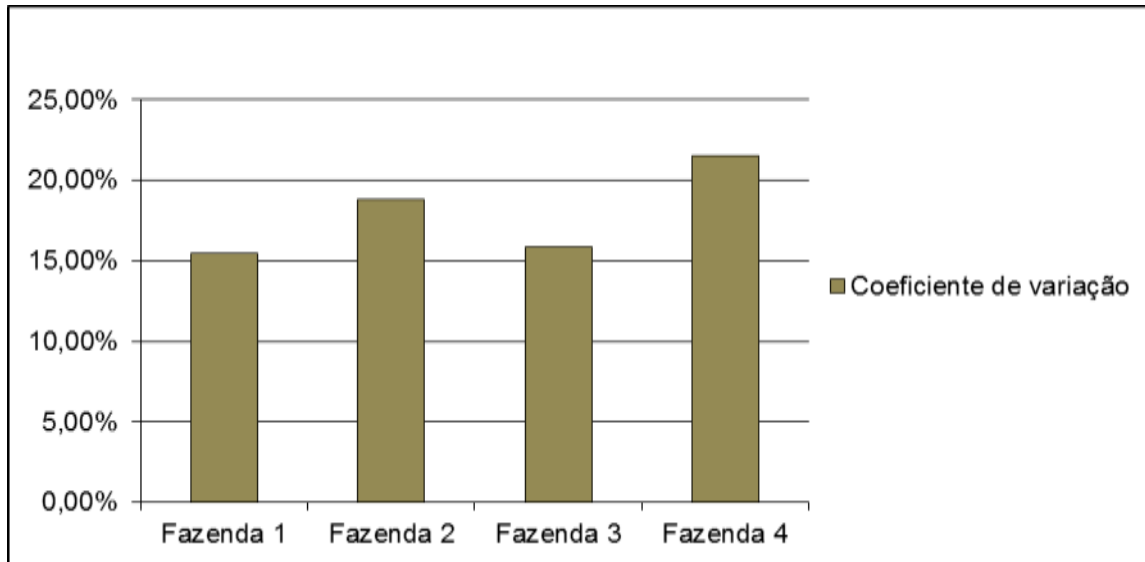
**TABELA 2** Resultados das amostras de leite submetidas ao ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-*M.bovis*.

	Amostras positivas*	Amostras negativas*	Total
Fazenda 1	1	9	10
Fazenda 2	3	14	17
Fazenda 3	2	8	10
Fazenda 4	1	9	10
Total	7	40	47

\* Teste de Kruskal-Wallis, ( $p>0,05$ )



**Gráfico 9** Valores das médias de D.O. das amostras de leite, divididas por fazenda.



**Gráfico 10** Valores de coeficiente de variação das D.O. das amostras de leite, divididos por fazenda.

## 5 DISCUSSÃO

A ausência de anticorpos anti- *M. bovis* nas amostras de soro fetal bovino estéril comercial, leite UAT e a baixa D.O. exibida quando as amostras foram submetidas ao ELISA corroboram a escolha destas amostras como controles negativos dos ensaios executados e a constatação da ausência de anticorpos anti- *M. bovis* verificada nas amostras de soros sanguíneo e leite obtidas das vacas antes da imunização e a baixa D.O. exibida quando estas amostras foram submetidas ao ELISA, demonstram que os animais escolhidos realmente não tinham sido infectados por *M. bovis*, o que garantiu o sucesso da hiperimunização resultado compatível com relatos de Howard et al. (1982). Enquanto a presença de zona de inibição de crescimento de colônias de *M. bovis*, nos testes de inibição de crescimento das amostras de soro sanguíneo e das amostras de leite coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização das vacas indicam a presença de anticorpos anti- *M. bovis* nestas amostras, confirmando o sucesso da imunização realizada.

A diferença de produção de anticorpos entre as coletas de amostras de leite realizadas, evidenciada após a execução do ELISA, demonstra uma diferença de resposta imunológica entre as vacas imunizadas, semelhante ao relato de Byrne e colaboradores (2005). Embora tenha sido evidenciado através dos testes de inibição de crescimento e do ELISA que as 2 vacas tiveram resposta imunológica frente ao imunógeno inoculado, foi constatado através do teste t de Student que havia diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os valores de D.O. das amostras de soro sanguíneo e leite das vacas A e B, encontrados durante a etapa de padronização dos ensaios. Portanto, optou-se pela utilização das amostras de soro sanguíneo e leite da vaca A coletadas 30 dias após a imunização porque estas apresentaram as maiores D.O. dentre todas as amostras testadas e seriam ideais para serem usadas como controles positivos dos ensaios que seriam executados, conforme relatos de Howard et al. (1982).

Os valores do coeficiente de variação dos soros sanguíneos e leites controle positivos e dos soros sanguíneos e leites controle negativos calculados entre os dias de execução dos ensaios foram pequenos, o que significa que os valores de D.O. obtidos foram similares, demonstrando a boa escolha dos controles assim como

mencionado por Liberal e Boughton (1992).

A diluição considerada ideal para as amostras de soro sanguíneo foi de 1:400 assim como descrito por Campos e colaboradores (2000) que também utilizaram antígeno celular total para a sensibilização das placas de microtitulação. E a diluição considerada ideal para as amostras de leite foi de 1:10, compatível com relato de Nicolet e Martel (1996).

O resultado total do ELISA com as 321 amostras de soro sanguíneo de vacas demonstra baixa prevalência (3,1%) de *M. bovis* entre os indivíduos estudados, assim como relatado por Pretto e colaboradores (2001), entretanto nota-se que em 46,7% das fazendas foram detectados animais positivos para o microrganismo em questão. No resultado total do ELISA com as 47 amostras de leite bovino houve uma prevalência considerável (14,9%) de *M. bovis* nos indivíduos estudados além do fato que em 100% das fazendas foram diagnosticados animais que já foram infectados por esse microrganismo, assim como relatado por Pretto e colaboradores (2001). A alta prevalência dentre as fazendas estudadas merece atenção, pois as vias de transmissão de *M. bovis* são principalmente por contato direto e possivelmente, transmissão por via congênita (PFÜTZNER; SACHSE, 1996). Além disso, o teste de Kruskal-Wallis evidenciou que não havia diferença estatística ( $p>0,05$ ) com relação à frequência de amostras leite positivas e à frequência de amostras de leite negativas entre as fazendas estudadas.

Os resultados positivos obtidos das amostras de soro sanguíneo indicam animais que já foram infectados por *M. bovis*, mas como não há informações sobre o histórico clínico, não é possível afirmar se o referido microrganismo esteve envolvido em casos de mastite ou outra enfermidade causada por *M. bovis*.

Entretanto, 1 dos 7 resultados positivos obtidos nas amostras de leite testadas sugere *M. bovis* como agente causador de mastite, pois além do fato dessa vaca ter histórico clínico de mastite, segundo relato de Byrne e colaboradores (2000) vacas acometidas por doenças causadas por *M. bovis* (excetuando-se a mastite) podem apresentar resposta imunológica detectável em amostras de soro sanguíneo, mas estes anticorpos podem não ser detectáveis no leite também.

## 6 CONCLUSÃO

A padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de soro sanguíneo e leite apresentou parâmetros satisfatórios e houve boa relação dos resultados obtidos no ensaio com os resultados do teste de inibição de crescimento consequentemente, foi possível aplicá-lo em 321 amostras de soro sanguíneo e 47 amostras de leite.

Na aplicação do ELISA indireto, foram diagnosticados animais que já foram infectados por *M. bovis* e as prevalências do referido microrganismo entre as fazendas estudadas foi mais significativa que as prevalências obtidas entre as amostras testadas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.I.; TIMENETSKY, J.; ÁVILA, F.A. Avaliação da imunogenicidade de uma vacina experimental obtida a partir de *Mycoplasma pulmonis* isolado de ratos (*Rattus norvegicus*) naturalmente infectados. *Ars veterinária*, v. 19, n. 01, p. 80-86, 2003.

AYLING, R.D.; BAKER, S.E.; PEEK, M.L.; SIMON, A.J.; NICHOLAS, R.A.J. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary record*, v. 146, p. 745-747, 2000.

BRANK, M.; LE GRAND, D.; POUMARAT, F; BÉZILLE, P.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. Development of a recombinant antigen for antibody-based diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 06, n. 06, p. 861-867.

BRASIL. *Abate de animais, produção de leite, couro e ovos*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 07 jan 2013.

\_\_\_\_\_. *Bovinos e bubalinos*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2013a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 07 jan 2013.

\_\_\_\_\_. *Importância econômica do leite*. EMBRAPA Gado de Leite, 2013b. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em: 07 jan 2013.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Projeções do Agronegócio: Brasil 2008/09 a 2018/19*. 1. ed. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 64 p.

BYRNE, W.J.; BALL, H.J.; BRICE, N.; MCCORMACK, R.; BAKER, S.E.; AYLING, R.D.; NICHOLAS, R.A.J. Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Veterinary Record*, v. 149, p.368-369, 2000.

BYRNE, W.J.; MARKEY, B.; MCCORMACK, R.; EGAN, J.; BALL, H.J; SACHSE, K. Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. *Veterinary Record*, v. 156, p. 767–771, 2005.

CAMPOS, C.A.M.; NASCIMENTO, E.R.; BARRETO, M.L.; NASCIMENTO, M.G.F.; VERÍCIMO, M.A. ELISA para o diagnóstico das infecções por *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritidis* em *Rattus norvegicus* de Biotério. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 22, n. 5, p. 207-210, 2000.

CASSELL, G.H.; BROWN, M.B. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of anti-mycoplasmal antibody. In: RAZIN S.; TULLY J.G. *Methods in Mycoplasmaology: Mycoplasma Characterization*. New York: Academic Press, 1983, v.1, p. 457-469.

CASSELL, G.H.; GAMBILL, G.; DUFFY, L. ELISA in respiratory infections of humans. In: TULLY J.G; RAZIN S. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. San Diego: Academic Press, 1996, v.2, p.123-136.

CHIMA, J.C.; WILKIE, B.N.; NIELSEN, K.H.; RUHNKE, H.L.; TRUSCOTT, R.B.; MAXIE, G.; CHICK, B. Synovial Immunoglobulin and antibody in vaccinated and nonvaccinated calves challenged with *Mycoplasma bovis*. *Canadian journal of comparative medicine*, v. 45, n. 01, p. 92-96, 1981.

DAVIDSON, M. K., DAVIS, J. K., GAMBILL, G. P., CASSEL, G. H.; LINDSEY, J. R. Mycoplasmas of Laboratory Rodents. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L. H. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. 1. ed. Ames: Iowa State University press, 1994. 173 p. cap. 8, p. 97-133.

FILIOUSSIS, G.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; THATCHER, A; PETRIDOU, V.; BOURTZI-CHATZOPOULOU,E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. *The Veterinary Journal*, v. 173, p. 215-218, 2007.

GOLL, F. Jr. Identification of mycoplasmas isolated from domestic animals. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. 1. ed. Ames: Iowa State University press, 1994. 173 p. cap. 3, p. 22-23.

HELLER, M.; BERTHOLD, E.; PFUTZNER, H.; LEIRER, R.; SACHSE, K. Antigen capture ELISA using a monoclonal antibody for the detection of *Mycoplasma bovis* in milk. *Veterinary microbiology*, v. 37, p. 127-133, 1993.

HOWARD, C.J.; GOURLAY, R.N.; THOMAS, L.H.; EYNON, J. Antibodies, by ELISA, to mycoplasmas in bovine sera. In: WARDLEY, R.C.; CROWTHER, J.R. *The ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis (Current topics in veterinary medicine and animal science)*. Dordrecht: Martinus nijhoff publishers, 1982. 321 p. v. 22, p. 90-101.

JASPER, D.E. *Mycoplasmas and bovine mastitis*. In: *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*. 1. ed. Ames: Iowa State University Press, 1994. 173p.

KIRKBRIDE, C.A. *Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma* infections of bovine genitalia. *The Veterinary Clinic of North America: Food Animal Practice*, v.3, p.575-591, 1987.

LE GRAND, D.; CALAVAS, D.; BRANK, M.; CITTI, C.; ROSENGARTEN, R.; BÉZILLE, P.; POUMARAT, F. Serological prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in suckling beef cattle in France. *Veterinary Record*, v. 150, p.268-273, 2002.

LIBERAL, M.H.T.; BOUGHTON, E. Comparison between Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Disc Film Inhibition and Complement Fixation tests for the diagnosis of *Mycoplasma bovis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.29, n.5, p. 823-830, 1994.

\_\_\_\_\_. Standardization of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Mycoplasma bovis*. *Revista de Microbiologia*, v. 23, n. 03, p.146-150, 1992.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the phenol reagent. *Journal Biologic Chemical*, v. 193, p.265-275, 1951.

MC AULIFFE, L.; ELLIS, R.J.; MILES, K.; AYLING, R.D.; NICHOLAS, R.A.J. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*, v. 152, p. 913-922, 2006.

METTIFOGO, E.; NASCIMENTO, E.R.; MULLER, E.E.; NASCIMENTO, M.G.F.; FREITAS, J.C. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 18, n. 1, p. 22-25, 1996.

NICHOLAS, R.A.J. The other *M. bovis*: *Mycoplasma bovis*. *State Veterinary Journal*, v. 7, p. 3-5, 1997.

NICHOLAS, R.A.J.; AYLING, R.D. *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control. *Research in Veterinary Science*, v. 74, p. 105-112, 2003.

NICHOLAS, R.A.J.; BAKER, S.; AYLING, R.D.; STIPKOVITS, L. *Mycoplasma* infections in growing cattle. *Cattle Practice*, v. 8, p. 115-118, 2000.

NICOLET, J.; MARTEL, J.L. ELISA in large animals. In: TULLY J.G; RAZIN S. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. San Diego: Academic Press, 1996, v.2, p. 105-113.

O'FARRELL, K.; DILLON, P.; MEE, J.; CROSSE, S.; NOLAN, M.; BYRNE, N.; REIDY, M.; FLYNN, F.; CONDON, T. Strategy for restocking Moorepark after depopulation following BSE. *Irish Veterinary Journal*, v. 54, p. 70-75, 2001.

ONOVIRAN, O.; ROBINSON, D.T. Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* in cattle by an enzyme linked immunosorbent assay. *The Veterinary Record*, v. 105, p. 165-167, 1979.

PFÜTZNER, H.; SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), v.15, n. 4, p. 1.477-1.494,1996.

PRETTO, L.G.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n.4, p. 143-145, 2001.

RASHED, A. Y. M.; EL-SHAFFEY, D. Y. H. Effect of some strains of *Mycoplasma* on serum and milk biochemistry of dairy cows. *Egyptian Journal of Comparative Pathology and Clinical Pathology*, v. 21, n. 3, p. 230-249, 2008.



- ROSENBUSCH, R.F. Biology and taxonomy of the *Mycoplasma*. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. 1. ed. Ames: Iowa State University press, 1994. 173 p. cap. 1, p.3-11.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada a Experimentação Animal*. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- STIPKOVITS, L.; RADY, M.; GLÁVITS, R. Mycoplasmal arthritis and meningitis in calves. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.41, p.73-88, 1993.
- TIZARD, R. Sorologia: Detecção e medição de anticorpos. In: \_\_\_\_\_. *Imunologia Veterinária: Uma introdução*. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998. 531 p. cap. 18, p. 239-231.
- TRONCO, V.M. Mastite e seu diagnóstico no leite. In: \_\_\_\_\_. *Manual para inspeção da qualidade do leite*. 4. ed. Santa Maria: UFSM, 2010. 195 p. cap. 7, p. 157-158.
- TULLY J.G. General cultivation techniques for mycoplasmas and spiroplasmas. In: RAZIN S.; TULLY J.G. *Methods in Mycoplasmosis: Mycoplasma Characterization*. New York: Academic Press, v.1, 1983. p. 99-101.
- WALKER, R.L. Mollicutes. In: HIRSH, E.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p. cap. 31, p.155-158.

## 8 ANEXOS

### 8.1 PROTOCOLO PARA PREPARO DO MEIO A

#### 8.1.1 Base

Caldo base para micoplasma (Caldo base PPLO)	22,5 g
Ácido desoxirribonucleico (DNA) de esperma de arenque	0,2 g
Ágar nobre (somente para meio sólido)	10 g
Vermelho de fenol	2,0 mL
Água destilada	600 mL

Após homogeneizar as substâncias, deve-se ajustar o pH com hidróxido de sódio 1N para 7,8-8,0 e esterilizar a base em autoclave à temperatura de 121°C por 15 minutos.

#### 8.1.2 Solução aditiva

Dextrose	5,0 g
Soro equino estéril e inativado	200 mL
Penicilina G potássica	1,0 mL
Água destilada	185 mL

Esterilizar a solução em filtro com membrana com poros 0,22 µm e, em seguida adicionar a base esterilizada.

### 8.2 SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA COM FOSFATOS (pH 7,2)

Cloreto de sódio	8 g
Cloreto de Potássio	0,2 g
Fosfato de sódio dibásico	1,15 g
Fosfato de potássio monobásico	0,2 g
Água destilada	1000 mL

### 8.3 SOLUÇÃO TAMPÃO CARBONATO-BICARBONATO 0,05 M

Carbonato de sódio	0,80 g
Bicarbonato de sódio	1,47 g
Água destilada	500 mL

O pH da solução deve ser 9,6.

### 8.4 SOLUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO 0,1 M

Ácido cítrico monohidratado	2,14 g
Água destilada	100 mL

### 8.5 SOLUÇÃO DE FOSFATO DE SÓDIO 0,2 M

Fosfato de sódio monobásico	2,84 g
Água destilada	100 mL

### 8.6 PREPARO DO SUBSTRATO PARA O ELISA

Ácido cítrico 0,1M	6,5 mL
Fosfato de sódio 0,2 M	7 mL
Água destilada	11,5 mL
Peróxido de hidrogênio (30 volumes)	5 $\mu$ L
Orto-fenilenediamina	10 mg

O pH do substrato deve ser 4,5.

### 8.7 SOLUÇÃO ÁCIDO SULFÚRICO 3N

Ácido sulfúrico P.A.	84,1 mL
Água destilada	1000 mL