



**Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Campus de Patos – PB**

**ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA, TOXOPLASMOSE,
MICOPLASMOSE EM REBANHOS CAPRINOS LEITEIROS DO
ESTADO DA PARAÍBA**

RODRIGO ANTÔNIO TORRES MATOS

**PATOS – PB
AGOSTO – 2017**



**Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Campus de Patos – PB**

**ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA, TOXOPLASMOSE, MICOPLASMOSE
EM REBANHOS CAPRINOS LEITEIROS
DO ESTADO DA PARAÍBA**

RODRIGO ANTÔNIO TORRES MATOS

Orientador: Prof. Dr. Felício Garino Junior

**PATOS – PB
AGOSTO - 2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

- M425a Matos, Rodrigo Antônio Torres
 Artrite encefalite caprina, toxoplasmose, micoplasmose em rebanhos caprinos leiteiros do Estado da Paraíba / Rodrigo Antônio Torres Matos. – Patos, 2017.
 93f. : il.; color.
- Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2017.
- “Orientação: Prof. Dr. Felício Garino Junior.”
 Referências.
1. Lentiviroses. 2. Mollicutes. 3. Fatores de risco. I. Título.
- CDU 616-036.22

RODRIGO ANTÔNIO TORRES MATOS

**ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA, TOXOPLASMOSE, MICOPLASMOSE
EM REBANHOS CAPRINOS LEITEIROS
DO ESTADO DA PARAÍBA**

Exame de qualificação aprovado pela Comissão Examinadora em: 22/02/2017

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Felício Garino Junior

Instituição: Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dra. Tatiane Rodrigues da Silva

Instituição: Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. Severino Silvano Hígino

Instituição: Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dra. Sara Vilar Dantas Simões

Instituição: Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dra. Layze Cilmara Alves da Silva

Instituição: Universidade Federal do Oeste Bahiano (UFOB)

Assinatura: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte inesgotável de amor e sabedoria, que me concedeu o dom da vida, saúde, inteligência necessárias à assimilação constante de novos conhecimentos.

Aos meus pais, Roberto e Telma, batalhadores incansáveis, pelo amor incondicional e por estarem sempre orientando-me, apoiando as minhas decisões e torcendo pelo meu sucesso durante toda a minha trajetória estudantil.

Aos meus irmãos, Romildo e Roberta, que sempre foram meus constantes incentivadores.

Aos meus avós, *in memoriam*, Mário, Torres e Zélia, pelos sábios conselhos e pelo apoio irrestrito durante a minha vida acadêmica.

Aos meus tios, Beto, Alice, Laura e Vanda que acreditaram no meu potencial e aguardavam esta vitória.

À minha noiva, Kayssa, pelo incentivo, apoio, amor, compreensão e cumplicidade durante todo o período do doutorado. Amo você!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felício Garino Junior, pela paciência, amizade e pelos ensinamentos valiosos. O senhor foi fundamental na minha formação acadêmica, o modelo no qual me inspirei e que jamais será esquecido, grande mestre.

A todos os competentes professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, pelos conhecimentos adquiridos e pelas sábias orientações recebidas.

À professora Melânia Loureiro Marinho, pela colaboração e parceria no desenvolvimento dos trabalhos ora apresentados.

Aos professores da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota e Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior, pela receptividade, pelo acolhimento e por todos os conhecimentos repassados durante a minha permanência na referida instituição. Agradeço, também, pela contribuição nos artigos.

À Doutora Sandra Batista dos Santos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela ajuda e pelos ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento do meu projeto.

Aos discentes de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em especial as colegas, Renata e Grazi, pela amizade e parceria durante a realização das minhas análises no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos.

Aos meus colegas de Laboratório, Dani, Ednaldo, Layze, Meire, Renata, pelo apoio diário, companheirismo e pela convivência fraterna e solidária.

A todos os meus colegas do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), pela troca de conhecimentos e pelo convívio salutar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa, que contribuiu para a consecução do meu objetivo.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

RESUMO

Realizaram-se estudos para verificar as prevalências da artrite encefalite caprina (AEC), agalaxia contagiosa e toxoplasmose caprina, determinar os fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* e investigar *Mollicutes* e Grupo *Mycoplasma mycoides* em amostras de pulmão de caprinos do estado da Paraíba, Brasil. Foram colhidas amostras de sangue de 191 caprinos, de ambos os sexos, estes provenientes de 17 propriedades para a realização do teste de imunodifusão em gel ágar (IDGA) para diagnóstico da AEC e amostras de sangue de 97 caprinos, de ambos os sexos, de 4 propriedades para o teste de imunofluorescência indireta (RIFI) para diagnóstico da toxoplasmose. Foi observada uma prevalência de 8,38 % (16/191) para AEC e 16,49% (16/97) para toxoplasmose caprina. A prevalência da AEC e da toxoplasmose caprina por propriedades rurais foi de 23,53% e 100%, respectivamente. O que demonstra a importância destas duas enfermidades no estado da Paraíba. Muitas vezes essas doenças são subdiagnosticadas e os animais se comportam como portadores assintomáticos. Portanto, deve-se realizar o monitoramento dessas doenças através de exames sorológicos e adotar medidas de controle e profilaxia para conter os avanços dessas doenças nos rebanhos caprinos da Paraíba. No estudo realizado para verificar a ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae*, foram utilizados para diagnóstico de *Mycoplasma agalactiae*, 251 amostras de leite, que foram submetidas à extração do DNA genômico usando um *kit* comercial, seguindo as recomendações do fabricante. Para diagnóstico da infecção utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Além disso, foram aplicados questionários para identificar os principais fatores de risco associados infecção à agalaxia contagiosa. Observou-se que 19,9% (50/251) das amostras de leite foram positivas na PCR para *M. agalactiae*. Observou-se na análise dos fatores de risco associação para as variáveis: tamanho do rebanho ($P < 0,001$; OR=7,1), reposição de animais da propriedade ($P < 0,001$; OR=4,7) e participação dos animais em feiras e exposições ($P = 0,029$; OR=2,0). Os resultados permitiram confirmar a ocorrência do *Mycoplasma agalactiae* em amostras de leite de caprinos da Paraíba. Portanto, é necessário o monitoramento dos rebanhos caprinos leiteiros e a conscientização dos produtores rurais para a importância econômica da doença, visto que a mesma acarreta severos prejuízos econômicos para os produtores. A identificação dos fatores de risco são imprescindíveis para a adoção de medidas de controle e para a correção dos fatores de manejo em propriedades que tenham animais

com diagnóstico positivo, evitando assim, a disseminação do patógeno. Para o diagnóstico de *Mollicutes* e grupo *Mycoplasma mycoides*, foram colhidas assepticamente em tubos falcon 100 amostras de pulmão (dois a três fragmentos de cada animal) de caprinos mestiços, de idades variadas, de ambos os sexos, com e sem lesões pulmonares provenientes de municípios do estado da Paraíba, Brasil. Para a realização do diagnóstico molecular foi utilizada a Reação de Cadeia de Polimerase (PCR). Das 100 amostras de pulmão analisadas, todas foram negativas para a PCR do grupo *Mycoplasma mycoides* e 3% (3/100) foram positivas na PCR para *Mollicutes*. As doenças respiratórias em pequenos ruminantes causadas por espécies de *Mycoplasma* estão cada vez mais presentes nos rebanhos caprinos, porém, são subdiagnosticadas. No Brasil, não existem relatos de problemas respiratórios, pneumonia ou pleuropneumonia em caprinos por *Mycoplasma* spp., sendo necessário a realização de estudos ou pesquisas para monitoramento destes agentes em caprinos com problemas respiratórios, tendo como objetivo a adoção de medidas de controle para impedir a disseminação de doenças respiratórias causadas por estes agentes.

Palavras-chave: lentivirose, *Mollicutes*, fatores de risco.

ABSTRACT

Studies were conducted to determine the prevalence of caprine arthritis-encephalitis (CAE), caprine toxoplasmosis and contagious agalactia, determine the risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* and investigate of *Mollicutes* and *Mycoplasma mycoides* cluster in lung samples from goats in Paraíba, Brazil. Blood samples were collected from 17 of 191 goats from rural farms in the state of Paraíba. Agar gel immunodiffusion test (AGID) was used for the diagnosis of CAE in serum samples of 97 goats from four rural farms. Toxoplasmosis was diagnosed with indirect immunofluorescence assay (IFA). A prevalence of 8.38% (16/191) for CAE and 16.49% (16/97) for caprine toxoplasmosis was found. The prevalence rates of CAE and caprine toxoplasmosis for rural farms where the present study was conducted were 23.53% and 100%, respectively. What demonstrates the importance of these two diseases in the Paraíba State. The lack of studies on these disorders reflect the need for monitoring dairy goat herds in Paraíba, as these diseases are underdiagnosed and the animals are asymptomatic carriers of the pathogens. Moreover, the accurate diagnosis of these diseases contribute to the elaboration of control and prevention measures. The study aimed to investigate the occurrence and risk factors associated with infection

by *M. agalactiae*, were utilized for *Mycoplasma agalactiae* diagnosis, 251 milk samples, were submitted to DNA extraction using a commercially available *kit*, following the manufacturer's instructions, and Chain Polymerase Reaction (PCR) was performed. In addition, questionnaires were applied to identify the main risk factors associated to contagious agalactia infection. Observed that 19.9% (50/251) of the milk samples tested PCR positive for *M. agalactiae*. ($P < 0.001$, OR = 7.1). Analysis of risk factors showed association for the following variables: size of herd ($P < 0.001$, OR = 7.1), replacement of farm animals ($P < 0.001$, OR = 4.7) and participation of the animals in fairs and exhibitions ($P = 0.029$, OR = 2.0). The results allowed confirming the occurrence of *M. agalactiae* in milk samples of goats in the state of Paraíba. Therefore, monitoring of dairy goat herds and the awareness of producers to the economic importance of the disease is necessary since *M. agalactiae* can bring economic losses for rural farmers. The identification of risk factors is essential for the adoption of control measures and for the correction of management-related factors in rural farms with animals that tested positive for the pathogens, in order to avoid its spread. For the diagnosis of *Mollicutes* and *Mycoplasma mycoides* cluster, were collected aseptically in falcon tubes 100 samples of lungs of crossbred goats, of different ages and both sexes, with and without lung lesions from cities in the state of Paraíba, Brazil. For molecular diagnosis was utilized the Polymerase Chain Reaction (PCR) test. All the 100 analyzed lung samples tested PCR negative for *Mycoplasma mycoides* cluster and 3% (3/100) tested PCR positive for *Mollicutes*. Respiratory diseases in small ruminants caused by *Mycoplasma* species are becoming increasingly common in goat herds, but are underdiagnosed. In Brazil, there are no reports of respiratory problems, pneumonia or pleuropneumonia in goats by *Mycoplasma* spp. Therefore, studies on the occurrence of these pathogens in goats with respiratory problems are needed to support the elaboration of control measures to prevent the spread of respiratory diseases caused by these agents.

Keywords: lentiviruses, *Mollicutes*, risk factors.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
Referências.....	14
CAPÍTULO I – Inquérito Soroepidemiológico da Artrite Encefalite Caprina (AEC) e da Toxoplasmose em rebanhos caprinos leiteiros da Paraíba, Brasil.....	15
Abstract.....	16
Resumo.....	17
Introdução.....	18
Material e Métodos.....	19
Resultados.....	20
Discussão.....	20
Conclusão.....	21
Referências bibliográficas.....	22
CAPÍTULO II – Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por <i>Mycoplasma agalactiae</i> em rebanhos caprinos leiteiros do estado da Paraíba, Brasil.....	27
Abstract.....	28
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	33
Conclusão.....	35
Referências bibliográficas.....	36
CAPÍTULO III – Molecular Investigation of <i>Mollicutes</i> and <i>Mycoplasma Mycoides</i> Cluster (MMC) in lung samples of goats of Paraíba State, Brazil.....	43
Abstract.....	44
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	46
Resultados.....	47
Discussão.....	47
Conclusão.....	48
Referências bibliográficas.....	49
CONCLUSÕES GERAIS.....	51
ANEXOS.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	Artrite Encefalite Caprina
CAE	Caprine Arthritis Encephalitis
ACOC	Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos
IFI	Imunofluorescence Indirect test
PCR	Reação de cadeia de Polimerase
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
SLRV	Small Lentivirus Ruminants Virus

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Resultados dos testes sorológicos para a artrite encefalite caprina e toxoplasmose caprina em caprinos leiteiros da microrregião do Cariri Ocidental, estado da Paraíba, avaliados no período de janeiro de 2011 a junho de 2016.....	26
---	----

CAPÍTULO II

Quadro 1. Análise dos fatores de risco associados à infecção por <i>Mycoplasma agalactiae</i> em caprinos leiteiros da Paraíba	40
Quadro 2. Análise de associação dos resultados da PCR com o histórico de manifestações clínicas em caprinos leiteiros da Paraíba.....	42

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Municípios da microrregião do Cariri Ocidental com caprinos reagentes para a Artrite Encefalite Caprina e/ou Toxoplasmose Caprina. O detalhe mostra o estado da Paraíba..... 25

CAPÍTULO II

Figura 1. Distribuição da prevalência nas 13 propriedades criadoras de caprinos leiteiros visitadas estado da Paraíba, no período de março de 2016 a abril de 2017.....39

INTRODUÇÃO

Os maiores efetivos de caprinos e ovinos encontram-se na região Nordeste, tendo um efetivo de aproximadamente 10,1 e 8,1 milhões de cabeças, respectivamente. Desse efetivo, a Paraíba possui 442.533 mil cabeças de ovinos e 507.589 mil cabeças de caprinos (IBGE, 2014).

A caprinovinocultura nos últimos anos vem despontando no agronegócio brasileiro como opção de diversificação da produção, gerando assim, oportunidades de emprego e renda para o homem do campo. Existem alguns fatores que podem acarretar em baixos índices de produtividade como: problemas relacionados a nutrição, sanidade e manejo dos animais, dificuldade em implementar novas tecnologias nas propriedades e em conquistar novos mercados consumidores (SEBRAE, 2007).

Um dos principais problemas relacionados aos baixos índices de produtividade são, as micoplasmoses, doenças estas que causam um enorme prejuízo a atividade leiteira. Destas, a mais comum em rebanhos leiteiros é a agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos (ACOC), responsável por diminuir de forma brusca ou por cessar a produção de leite nessas espécies, além disso, os animais podem apresentar sinais clínicos como, artrites, poliartrites, ceratites e aborto.

Dentre o contexto de doenças de importância na caprinocultura, destacam-se também: toxoplasmose e artrite encefalite caprina, as quais são enfermidades infecto-contagiosas de distribuição mundial, onde os caprinos assumem um importante papel na cadeia epidemiológica, sendo a primeira de grande importância em saúde pública. Estas doenças afetam negativamente a produção de pequenos ruminantes, ocasionando redução do ganho de peso, diminuição da qualidade e rendimento das carcaças, resultando em perdas reprodutivas e econômicas dos rebanhos (PIRES, 2009). Estas doenças já foram diagnosticadas, mas mesmo assim, continuam ocorrendo surtos na região, o que demonstra a necessidade de realização de estudos relacionados à ocorrência e disseminação destas doenças no estado da Paraíba.

REFERÊNCIAS

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário, 2014. Rio de Janeiro, 2014.

PIRES, C.R.S. Estudo soroepidemiológico de *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii*, e vírus da artrite encefalite caprina em rebanhos caprinos nas unidades produtoras dos estados do Pará e Maranhão. 2009, 75f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Belém, 2009.

SEBRAE. Perfil Setorial da Caprinocultura no Mundo, Brasil, Nordeste e Sergipe. Sergipe, 2007. Disponível em: <[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/49A7E70DA9FFD4FA832573840040EE7C/\\$File/PERFIL%20SETORIAL%20DA%20CAPRINOVINOCULTURA.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/49A7E70DA9FFD4FA832573840040EE7C/$File/PERFIL%20SETORIAL%20DA%20CAPRINOVINOCULTURA.pdf)>. Acesso em: out. 2013.

**CAPÍTULO I- Inquérito Soroepidemiológico da Artrite Encefalite Caprina (AEC)
e da Toxoplasmose em rebanhos caprinos leiteiros da Paraíba, Brasil**

O artigo foi submetido à Revista Brasileira de Medicina Veterinária – ISSN 0100-2430
Qualis B2

**Inquérito Soroepidemiológico da Artrite Encefalite Caprina (AEC) e da
Toxoplasmose em rebanhos caprinos leiteiros da Paraíba, Brasil**

Rodrigo Antônio Torres Matos¹, Arthur Willian de Lima Brasil²; Thiago Lima da Silva
Gomes³, João Marcos de Araújo Medeiros⁴, Eldinê Gomes Miranda Neto⁵, Felício
Garino Júnior⁶

ABSTRACT. Matos R.A.T., Brasil A.W.L., Gomes T.L.S., Medeiros J.M.A., Miranda Neto E.G. & Garino Júnior F. [Seroepidemiological survey of Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) and Toxoplasmosis in dairy goat herds of Paraíba, Brazil.] Inquérito Sorológico para Artrite Encefalite Caprina (AEC) e da Toxoplasmose em rebanhos caprinos leiteiros da Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 00(0):00-00, 1900. Programa de Pós-Graduação em Medicina veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brasil. E-mail: rodrigoatmatos@gmail.com.

¹ Médico Veterinário, Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brasil. E-mail: rodrigoatmatos@gmail.com

² Médico Veterinário, Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brasil. E-mail: arthurwillian7@yahoo.com.br

³ Médico Veterinário, MSc, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER), Praça Monsenhor Expedito, 104, São Paulo do Potengi, RN 59460-000, Brasil. E-mail: thiagovet222@hotmail.com

⁴ Médico Veterinário, MSc, Farmácia Veterinária Serv Campo, Rua Augusto Monteiro, 76, Caicó, RN 59300-000, Brasil. E-mail: Medeirosvet15@hotmail.com

⁵ Médico Veterinário, Professor, DSc, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brasil. E-mail: eldinemneto@hotmail.com

⁶ Biólogo, Professor, PhD, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brasil. Email: garinofjr@hotmail.com

The aim of the present study was to verify the current status of caprine arthritis encephalitis (CAE) and caprine toxoplasmosis in dairy goats herds of Paraíba. Blood samples were collected of 191 goats, of both sexes, from 17 farms for performing the agar gel immunodiffusion test (AGID) for CAE diagnosis, and blood samples of 97 goats, of both sexes, from 4 farms for the indirect immunofluorescence test (IIF) for toxoplasmosis diagnosis. It was observed prevalences of 8,38% (16/191) for CAE and 16,49% (16/97) for caprine toxoplasmosis. The prevalences of CAE and caprine toxoplasmosis for rural farms were 23,53% and 100%, respectively. Often these diseases are underdiagnosed and animals behave as asymptomatic carriers. Therefore, these diseases should be monitored through serological tests and control and prophylaxis measures should be adopted to contain your progress in the goat herds of Paraíba.

KEY WORDS. Lentiviruses, AGID, IIF, Goats.

RESUMO. Objetivou-se com o presente estudo verificar o status atual da artrite encefalite caprina (AEC) e da toxoplasmose caprina em rebanhos caprinos leiteiros da Paraíba. Foram colhidas amostras de sangue de 191 caprinos, de ambos os sexos, de 17 propriedades para a realização do teste de imunodifusão em gel ágar (IDGA) para diagnóstico da AEC e amostras de sangue de 97 caprinos, de ambos os sexos, de 4 propriedades para o teste de imunofluorescência indireta (RIFI) para diagnóstico da toxoplasmose. Foi observada uma prevalência de 8,38 % (16/191) para AEC e 16,49% (16/97) para toxoplasmose caprina em animais. A prevalência da artrite encefalite caprina e da toxoplasmose em caprina por propriedades rurais foi de 23,53% e 100%, respectivamente. Muitas vezes estas doenças são subdiagnosticadas e os animais se comportam como portadores assintomáticos. Portanto, deve-se realizar o monitoramento dessas doenças através de exames sorológicos e adotar medidas de controle e profilaxia para conter os seus avanços nos rebanhos caprinos da Paraíba.

PALAVRAS-CHAVE. Lentiviruses, IDGA, RIFI, Caprinos.

INTRODUÇÃO

A artrite encefalite caprina (AEC) é caracterizada como uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, causada por um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus*, que infecta caprinos em várias fases do desenvolvimento etário, independente do sexo, raça e produção (Lara et al. 2005). As fontes de infecção são os animais infectados, que transmitem a doença nas suas excreções ou secreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário. A forma mais frequente de transmissão em cabritos é pela ingestão de colostro e leite contaminado. Ocasionalmente pode ocorrer transmissão horizontal através de contaminação com saliva, fezes, secreções do reprodutor e através do leite, contaminando as ordenhadeiras mecânicas. A ocorrência da transmissão vertical da mãe para o feto não é frequente, mas pode ocorrer (Moojen & Riet-Correa 2007).

No Brasil, a ocorrência de animais soropositivos tem sido registrada em vários estados, sendo observada prevalência de 0% até 50,6% (Lima et al. 2013). Estudos têm demonstrado que a enfermidade encontra-se disseminada por diversas regiões do país, nos estados de Minas Gerais (Assis & Gouveia 1994), Pernambuco (Castro et al. 1994), Ceará (Pinheiro et al. 2001), Rio de Janeiro (Lilenbaum et al. 2007) e Tocantins (Sobrinho et al. 2010).

A toxoplasmose é uma antropozoonose cosmopolita, causada por *Toxoplasma gondii* que é um protozoário intracelular obrigatório. A maioria das infecções é inaparente ou latente (Hill et al. 2005). A transmissão nos caprinos ocorre através da ingestão de oocistos esporulados pastagens ou pela ingestão de vetores mecânicos contaminados. Nas criações de caprinos, a presença da toxoplasmose ocasiona perdas econômicas por abortos e mortes neonatais (Breuning, 2008). Esta doença é bastante importante devido ao seu caráter zoonótico. Este protozoário já foi encontrado no leite de diversas espécies animais, porém, apenas o consumo de leite caprino por humanos foi associado à transmissão da enfermidade (Castro, 2006). O consumo de carnes ou derivados crus tem sido a principal via de transmissão para os humanos, sendo que as de ovinos, caprinos, equinos e suínos têm maior importância, por normalmente apresentarem maior frequência de cistos teciduais (Tenter et al. 2000, Rossi et al. 2014). Os estudos sobre a soroprevalência da toxoplasmose em caprinos no Brasil relatam prevalências de 14,47% até 40,8% (Mainardi et al. 2000, Silva et al. 2003, Nunes et al. 2016). Na Paraíba, destacam-se os estudos realizados por Castro et al. (2002) e Bandeira et al. (2009) sobre a artrite encefalite caprina e os trabalhos desenvolvidos por

Faria et al. (2007) e Santos et al. (2012) sobre a toxoplasmose caprina. Faltam estudos recentes referentes à ocorrência destas doenças no Estado da Paraíba, por isso faz-se necessário a realização de mais trabalhos de monitoramento destas enfermidades nos rebanhos caprinos. Portanto, objetivou-se com o presente trabalho verificar o status atual da artrite encefalite caprina e da toxoplasmose caprina em animais e em propriedades criadoras de caprinos leiteiros da Paraíba.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado nos municípios de Monteiro (7° 53' S e 37° 5' W), Prata (07° 41' 27" S e 37° 04' 49" W), Serra Branca (07° 29' 00" S e 36° 39' 54" W) e Sumé (07° 40' 18" S e 36° 52' 48" W), situados na microrregião do Cariri Ocidental, estado da Paraíba, no Nordeste do Brasil (Figura 1). Foram colhidas amostras de sangue de 191 caprinos, de ambos os sexos, provenientes de 17 propriedades, para a realização do teste de imunodifusão em gel ágar (IDGA) com a finalidade de realizar o diagnóstico da AEC e amostras de sangue de 97 caprinos, de ambos os sexos, provenientes de 4 propriedades, para o teste de imunofluorescência indireta (RIFI) com o intuito de realizar o diagnóstico da toxoplasmose. Foi considerada positiva, a propriedade que apresentava pelo menos um animal reagente para uma das duas doenças. Todos os animais eram de aptidão leiteira das raças Saanen, Parda alpina e mestiços, de diferentes idades, vacinados contra raiva e clostridioses. A maioria dos animais não apresentava sinais clínicos aparentes, porém, em algumas propriedades foi possível observar animais com poliartrite, emagrecimento progressivo, escore corporal baixo e foi relatada a ocorrência de abortos e nascimentos de crias fracas, que terminavam indo a óbito.

Foram coletados 10 mL de sangue de cada animal por punção da veia jugular externa em tubos de ensaio a vácuo. O material coletado foi acondicionado em caixas de isopor com gelo e o mesmo foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), localizado no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande-Centro de Saúde e Tecnologia Rural-Campus de Patos. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e os soros foram transferidos para tubos do tipo eppendorf de 1,5 e 2 mL e armazenados a -20 °C. Posteriormente, esse material foi enviado para o Laboratório TECSA situado na cidade de Belo Horizonte em Minas Gerais, para a realização de exames sorológicos. Para diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina (AEC) foi realizada a técnica de IDGA e para o diagnóstico da Toxoplasmose caprina utilizou-se a técnica de RIFI.

Este trabalho foi realizado conforme os princípios éticos de experimentação animal e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Campina Grande. O referido artigo faz parte de um projeto que tem como número de protocolo CEP 296/2015.

RESULTADOS

Os resultados de animais reagentes e não reagentes nos testes de IDGA para artrite encefalite caprina e RIFI para toxoplasmose caprina estão apresentados na Tabela 1.

Das propriedades rurais avaliadas para AEC, 23,53% (4/17) apresentaram animais reagentes. A prevalência da AEC por município foi de 11,11% para Monteiro, 15% para Prata, 11,63% para Serra Branca e 1,3% para Sumé. Dos animais testados para toxoplasmose caprina, 16,49% (16/97) foram reagentes. Das quatro propriedades avaliadas para a presença de toxoplasmose, todas apresentaram animais reagentes. A prevalência da toxoplasmose caprina por município foi de 15 % para Prata, 13,72% para Serra Branca e 23,08% para Sumé, não sendo avaliado o município de Monteiro para toxoplasmose caprina.

DISCUSSÃO

A frequência de anticorpos para AEC observado no presente estudo é semelhante aos levantamentos realizados por Bandeira et al. (2009), que verificaram uma soroprevalência de 8,2% na Paraíba e Torres et al. (2009), que observaram uma prevalência de 8% na Bahia. No Brasil, estudos tem verificado que a prevalência varia de 0 a 50,6% (Lima et al. 2013), sendo verificada uma alta prevalência na maioria dos trabalhos realizados na região Nordeste (Pinheiro et al. 2001, Castro et al. 2002, Melo et al. 2003). No estudo realizado por Pinheiro et al. (2001) no Ceará, com 810 amostras de soro caprino, verificaram uma prevalência de infecção para a AEC em rebanhos leiteiros de 4,6% (37/810). Lima et al. (2013) em estudo realizado no estado da Bahia, observaram uma prevalência baixa (0,29%) para a AEC em caprinos provenientes de propriedades que visavam principalmente à obtenção de carne. No presente estudo, a prevalência foi muito maior do que a observada por Lima et al. (2013), tal diferença deve-se, possivelmente, à utilização de caprinos de leite, uma vez que o contato direto e a amamentação coletiva podem contribuir para a disseminação do vírus. Outros fatores também podem contribuir para a diferença entre os resultados, tais como: manejo dos

animais, diferenças entre regiões, número de animais e rebanhos avaliados e processo de melhoramento genético, com aquisição de animais de outras regiões do país.

Tem-se observado que à medida que os rebanhos passam por um processo de melhoramento genético, sobretudo com a aquisição de animais leiteiros, existe tendência em aumentar a prevalência da AEC e o número de rebanhos afetados, como observado nas bacias leiteiras da Paraíba (Bandeira et al. 2009). Além disso, o empréstimo de reprodutores também é importante na disseminação da doença entre os rebanhos. Na espécie caprina, valores semelhantes de prevalência de infecção por *Toxoplasma gondii* foram observados no Brasil por Mainardi et al. (2000) em São Paulo (14,47%) e Lima et al. (2008) no Rio grande do Norte (17%). Entretanto, nos trabalhos realizados por Anderlini et al. (2011) e Bispo et al. (2011), foram observadas, respectivamente, prevalências de 39 % no estado de Alagoas e de 47,6% no estado de Pernambuco. Silva et al. (2003), em estudo realizado no estado de Pernambuco, verificaram uma prevalência para caprinos de 40,4%. Alguns fatores como, idade dos animais e região estudada, podem contribuir para as diferentes taxas de infecção observadas nos estudos sorológicos. Fatores como: manejo dos animais, sistema de criação também podem levar à disseminação da enfermidade. Além dos estudos sorológicos, a avaliação dos fatores de risco é igualmente importante para o controle e prevenção da doença. Fatores como raça, idade, sexo e sistema de produção são comumente utilizados para avaliar o risco da doença em rebanhos. Embora não tenha sido realizada a coleta de dados e nem a análise dos fatores de risco, foi observado em vários estudos que a idade, o sexo, o grupamento genético dos animais, a região e o sistema de criação podem ser determinantes para uma maior ou menor prevalência nos rebanhos.

CONCLUSÃO

Muitas vezes estas enfermidades são subdiagnosticadas e os animais se comportam como portadores assintomáticos. Portanto, deve-se realizar o monitoramento destas enfermidades através de exames sorológicos, bem como a adoção de medidas de controle e profilaxia para conter os seus avanços nos rebanhos caprinos da Paraíba.

REFERÊNCIAS

- Anderlini G.A., Mota R.A., Faria E.B., Cavalcanti E.F.T.S.F., Valença R.M.B., Pinheiro Júnior J.W., Albuquerque P.P.F & Souza Neto O.L. Occurrence and risk factors associated with infection by *Toxoplasma gondii* in goats in the State of Alagoas, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 44:157-162, 2011.
- Assis A.P.M.V. & Gouveia A.M.G. Evidência sorológica de lentivírus (maedi-visna/artrite-encefalite caprina) em rebanhos nos estados de MG, RJ, BA e CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23,1994, Olinda. Anais... Olinda: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1994, 104p.
- Bandeira D.A., Castro R.S., Azevedo E.O., Melo L.S.S. & Melo C.B. Seroprevalence of caprine arthritis–encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. *The Vet J*, 180:399-401, 2009.
- Bispo M.S., Faustino M.A.G., Alves L.C., Salcedo J.H.P., Souza C.H., Sousa D.P. & Lima M.M. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em propriedades de criação de caprinos e ovinos no estado de Pernambuco. *Cienc. Anim. Bras.*, 12:291-297, 2011.
- Breuning, J. Toxoplasmose em caprinos. *Caprinforma*. Ano V: 2008, p.4.
- Castro R.S., Nascimento S.A. & Abreu S.R.O. Evidência sorológica de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros do Estado de Pernambuco. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 46:571-572, 1994.
- Castro R.S., Azevedo E.O., Tabosa I., Nascimento S.A. & Oliveira M.M.M. Anticorpos para o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina em animais sem raça definida (SRD) de abatedouros dos estados de Pernambuco e Paraíba. *Ciênc.Vet. Trop.*, Recife, 5:121-123, 2002.
- Castro A.P.B. Implicações da toxoplasmose na saúde pública. 2006. 45f. *Dissertação (Mestrado)* – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- Faria E.B., Gennari S.M., Pena H.F., Athayde A.C., Silva M.L. & Azevedo S.S. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. *Vet. Parasitol.*, 149:126-129, 2007.
- Hill D.E., Chirukandoth S. & Dubey J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim. Health Res. Rev.*, 6:41-61, 2005.

- Lara M.C.C.S.H., Birgel Junior E.H., Gregory L. & Birgel E.H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57:736-740, 2005.
- Lilenbaum W., Souza G.N., Ristow P., Moreira M.C., Fráguas S., Cardoso V.S. & Oelemann W.M. A serological study on *Brucella abortus*, caprine arthritis-encephalitis virus and *Leptospira* in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *The Vet. J.*, 173:408-412, 2007.
- Lima J.T.R., Ahid S.M.M., Barrêto Júnior R.A., Pena H.F.J, Dias R.A. & Gennari S.M. Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 45:81-86, 2008.
- Lima C.C.V., Costa J.N., Souza T.S., Martinez P., Costa Neto A.O., Anunciação A.V.M., Almeida M.G.A.R., Araújo B.R. & Pinheiro R.R. Inquérito soropidemiológico do lentivírus caprino e perfil das criações de caprinos na região do Baixo Médio São Francisco (BA). *Arq. Inst. Biol.*, 80:288-296, 2013.
- Mainardi R.S., Stachissini A.V.M., Langoni H., Padovani C.R. & Modolo J.R. Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no estado de São Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 9:97-99, 2000.
- Melo C.B., Castro R.S., Oliveira A.A., Fonte L.B., Callado A.K., Nascimento S.A., Melo L.E.H. & Silva J.S. Estudo preliminar sobre a infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos e caprinos em Sergipe. In: XI CONGRESSO LATINOAMERICANO, V CONGRESSO BRASILEIRO, III CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA, 2003, Salvador. Anais... 2003, 47p.
- Moojen V. & Riet-correa F. Artrite-encefalite caprina, p.72-80. In: Riet-correa F. (Ed.), Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. *Doenças de ruminantes e equídeos*. 3rd.ed. Pallotti, Santa Maria. 2007.
- Nunes G.D.L., Santos F.S., Jesus F.R., Sampaio M.M.A.P., Zacharias F., Teixeira M.C.A. & Mendonça-Lima F.W. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos do semiárido bahiano. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.*, 23:143-147, 2016.
- Pinheiro R.R., Gouveia A.M.G. & Alves F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. *Ciênc. rural*, 31: 449-454, 2001.
- Rossi G.A.M., Grisólio A.P.R., Prata L.F., Bürger K.P. & Hoppe E.G.L. Situação da cisticercose bovina no Brasil. *Semin: Ciênc. Agrár.*, 35:927-938, 2014.

- Santos C.S.A.B., Azevedo S.S., Soares H.S., Higino S.S.S., Pena H.F.J., Alves C.J. & Gennari S.M. Risk factors associated with *Toxoplasma gondii* seroprevalence in goats in the State of Paraíba, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 21:399-404, 2012.
- Silva A.V., Cunha E.L.P. & Meireles L.R. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. *Ciênc. rural*, 33:115-119, 2003.
- Sobrinho P.A.M., Ramos T.R.R., Fernandes C.H.C., Campos A.C., Costa L.M. & Castro R.S. Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no estado do Tocantins. *Ciênc. Anim. Bras.*, 11:117-124, 2010.
- Tenter A.M., Heckeroth A.R. & Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, 30:217-258, 2000.
- Torres J.A., Campos G.S., Freitas M.M., Brandão C.F.L. & Sardi S.I. Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico da artrite-encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático (ELISA). *Rev. Ciênc. Med. Biol.*, 8:107-114, 2009.

Legenda da Figura

Figura 1. Municípios da microrregião do Cariri Ocidental com caprinos positivos para a Artrite Encefalite Caprina e/ou Toxoplasmose Caprina. O detalhe mostra o estado da Paraíba.

Legenda da Tabela

Tabela 1. Resultados dos testes sorológicos para a artrite encefalite caprina e toxoplasmose caprina em rebanhos caprinos leiteiros da microrregião do Cariri Ocidental, estado da Paraíba.

Figura 1. Municípios da microrregião do Cariri Ocidental com caprinos positivos para a Artrite Encefalite Caprina e/ou Toxoplasmose Caprina. O detalhe mostra o estado da Paraíba.

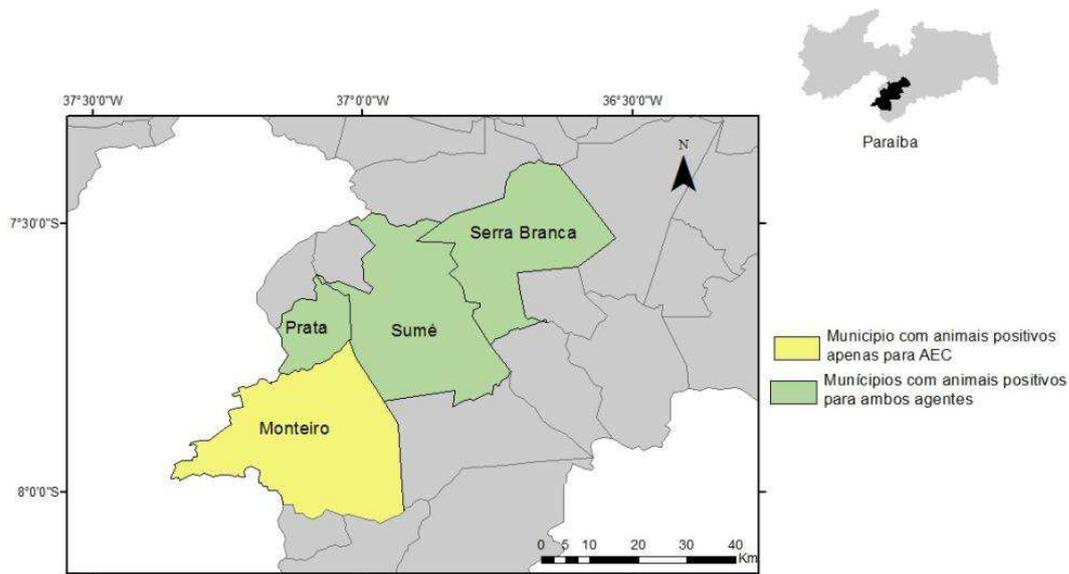


Tabela 1. Resultados dos testes sorológicos para a artrite encefalite caprina e toxoplasmose caprina em rebanhos caprinos leiteiros da microrregião do Cariri Ocidental, estado da Paraíba.

Nº de animais	Artrite Encefalite Caprina (IDGA)		Toxoplasmose (RIFI)	
	n	%	n	%
Positivos	16	8,38	16	16,49
Negativos	175	91,62	81	83,51
Total	191	100,0	97	100,0

**CAPÍTULO II- Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por
Mycoplasma agalactiae em rebanhos caprinos leiteiros do estado da Paraíba, Brasil**

O artigo foi submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira – ISSN 1678-5150

Qualis A2

Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos caprinos leiteiros do estado da Paraíba, Brasil¹

Rodrigo Antônio Torres Matos^{2*}, Sandra Batista dos Santos³, Renato Vaz Alves⁴,
Ednaldo José da Silva², Melânia Loureiro Marinho⁴, José Wilton Pinheiro Júnior⁵,
Rinaldo Aparecido Mota³ e Felício Garino Júnior²

ABSTRACT.- Matos R.A.T., Santos S.B., Alves R.V., Silva E.J., Marinho M.L., Júnior J.W.P., Mota R.A. & Garino Júnior F. [**Ocurrance and risk factors associated with the *Mycoplasma agalactiae* infection in Dairy Goat herds of the Paraíba State, Brazil.**] Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos caprinos leiteiros do estado da Paraíba, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Medicina veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brasil. E-mail: rodrigoatmatos@gmail.com.

Mycoplasmosis is a disease that may cause severe economical losses in goat and sheep herds associated with mastitis, polyarthritis, agalactia, conjunctivitis, pneumonia and reproductive failure. The objective of this study was to determine the occurrence of *Mycoplasma agalactiae* in milk samples and investigate the main risk factors associated with infection in goats from farms of the state of Paraíba, Brazil. For *Mycoplasma agalactiae* diagnosis, 251 milk samples were submitted to DNA extraction using a commercially available *kit*, following the manufacturer's instructions, and Chain Polimerase Reaction (PCR) was performed. In addition, questionnaires were applied to identify the main risk factors associated to infection by *Mycoplasma agalactiae*. Out of the two hundred fifty-one samples analyzed, 50 (19.9%; I.C. 15.1- 25.4%) were PCR

*¹ Recebido em....

Aceito para publicação em...

² Laboratório de Microbiologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brasil. *Autor para correspondência: rodrigoatmatos@gmail.com

³ Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, 52171-900, Brasil.

⁴ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG, Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brasil.

⁵ Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, 52171-900, Brasil.

positive for *M. agalactiae*. In the risk factors analysis, It was observed association for the following variables: size of the herd ($P < 0.001$; OR=7.1; I.C. 2.4-20.6), replacement of farm animals ($P < 0.001$; OR=4.7; I.C. 1.8-12.2) and participation of animals in fairs and exhibitions ($P = 0.029$; OR=2.0; I.C. 1.0-3.9). The results allowed to confirm the occurrence of *Mycoplasma agalactiae* in milk samples of goats from Paraíba. Therefore, it is strictly necessary to monitor dairy goats flocks and the awareness of farmers about the economic importance of the disease, since it causes severe economic losses for the producers and for the dairy goat of the state. The identification of risk factors is essential for the adoption of control measures and for the correction of the management factors in farms where there are animals with positive diagnosis, avoiding so the pathogen dissemination.

INDEX TERMS: contagious agalactia, micoplasmosis, PCR.

RESUMO.- As micoplasmoses ocasionam prejuízos econômicos nas criações de ovinos e caprinos, associados com mastite, poliartrite, agalaxia, conjuntivite, pneumonia e falhas reprodutivas. Objetivou-se neste estudo determinar a ocorrência de *Mycoplasma agalactiae* em amostras de leite e investigar os principais fatores de risco associados à infecção em caprinos provenientes de propriedades rurais do Estado da Paraíba, Brasil. Para o diagnóstico de *Mycoplasma agalactiae*, foram analisadas 251 amostras de leite, que foram submetidas à extração do DNA genômico usando um *kit* comercial, seguindo as recomendações do fabricante. Para diagnóstico da infecção utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Além disso, foram aplicados questionários para identificar os principais fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae*. Das 251 amostras analisadas, 50 (19,9%; I.C. 15,1- 25,4%) foram positivas na PCR para *M. agalactiae*. Observou-se na análise dos fatores de risco associação para as variáveis: tamanho do rebanho ($P < 0,001$; OR 7,1), reposição de animais da propriedade ($P < 0,001$; OR 4,7) e participação dos animais em feiras e exposições ($P = 0,029$; OR 2,0). Os resultados permitiram confirmar a ocorrência do *Mycoplasma agalactiae* em amostras de leite de caprinos da Paraíba. Portanto, é necessário o monitoramento dos rebanhos caprinos leiteiros e a conscientização dos produtores rurais para a importância econômica da doença, visto que a mesma acarreta severos prejuízos econômicos para os produtores. A identificação dos fatores de risco são imprescindíveis para a adoção de

medidas de controle e para a correção dos fatores de manejo em propriedades que tenham animais com diagnóstico positivo, evitando assim, a disseminação do patógeno.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: agalaxia contagiosa, micoplasmose, PCR.

INTRODUÇÃO

As micoplasmoses são doenças causadas por bactérias da classe *Mollicutes*, que são considerados os menores procariontes auto-replicantes sem parede celular (Chazel et al. 2010). Em caprinos, as principais micoplasmoses são a Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) (Oie 2014) e a Agalaxia Contagiosa dos Ovinos e Caprinos (ACOC) (Oie 2013). Esta doença pode ocasionar mastite, agalaxia, poliartrite, ceratoconjuntivite e, ocasionalmente, aborto e pneumonia (Gómez-Martín et al. 2013). O principal agente da ACOC é *Mycoplasma agalactiae*, embora outras espécies como: *M. capricolum* subsp *capricolum*, *M. putrefaciens* e *M. mycoides* subsp *capri* também possam ocasionar a doença (Madanat et al. 2002, Gil et al. 2003).

A infecção ocorre por via oral, respiratória ou mamária. Após um período de bacteremia, ocorre disseminação para o globo ocular, glândula mamária, articulações, tendões, útero e linfonodos. Podem ser observados, nascimento de crias inviáveis e abortos. A infecção transplacentária já foi descrita em cabritos (Azevedo et al. 2012). A infecção por *Mycoplasma agalactiae* se dissemina no rebanho por contato direto com animais infectados e no ambiente através do leite e equipamentos de ordenha contaminados, descarga ocular e mãos dos ordenhadores. Também pode ser transmitida por via venérea (Madanat et al. 2001).

A ACOC encontra-se distribuída geograficamente na Europa, Ásia Ocidental, USA e Norte da África, sendo endêmica na maioria dos países do Mediterrâneo (Gil et al. 2003). No Brasil, o isolamento de *Mycoplasma agalactiae* foi realizado a partir de caprinos doentes em 2001, na Paraíba (Azevedo et al. 2006). Em seguida a ocorrência da doença foi registrada nos Estados de Pernambuco e Rio grande do Norte (Azevedo 2005).

A doença já foi diagnosticada na microrregião do Cariri Paraibano (Bandeira et al. 2008). Entretanto, não existem estudos recentes e não se têm dados sobre a situação atual da doença no Estado da Paraíba, além disso, não se conhecem bem os fatores de

risco que podem estar associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* em caprinos leiteiros. Objetivou-se com esta pesquisa verificar a ocorrência de *Mycoplasma agalactiae* em amostras de leite e investigar os principais fatores de risco associados à infecção em caprinos provenientes de propriedades rurais de microrregiões do Estado da Paraíba, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área do estudo e Amostragem. No período de março de 2016 a abril de 2017 foram selecionadas e visitadas 13 propriedades produtoras de leite de cabras localizadas nas microrregiões do Cariri Paraibano Ocidental e Oriental, Curimataú Ocidental e Seridó Oriental, municípios de Gurjão (07° 14' 48" S e 36° 29' 22" W), Juazeirinho (07° 04' 06" S e 36° 34' 40" W), Monteiro (07° 53' 22" S e 37° 07' 12" W), Nova Floresta (06° 27' 19" S e 36° 12' 12" W), Prata (07° 41' 27" S e 37° 04' 49" W), São Sebastião do Umbuzeiro (08° 09' 08" S e 37° 00' 37"W) e Zabelê (08° 04' 32" S e 37° 05' 54" W). O critério utilizado para seleção das propriedades foi uma amostragem por conveniência, considerando para tal a ocorrência de sinais clínicos sugestivos de infecção por *Mycoplasma agalactiae*.

O tamanho da amostra que compôs o estudo de prevalência foi determinado considerando-se uma prevalência esperada para a infecção de 10% para caprinos (Santos et al. 2014), que determinou uma amostragem mínima de 138 caprinos. Considerando o nível de significância de 95% e erro estatístico de 5% (Thrusfield 2004).

Para o cálculo do número de animais foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$n = 1,96^2 \cdot P_{\text{esp}} \cdot (1 - P_{\text{esp}}) / d^2; n_{\text{ajust}} = (N \times n) / (N + n)$$

Onde:

n= número mínimo de caprinos a serem amostrados

N= número total de caprinos no rebanho

P_{esp} = prevalência esperada

d^2 = precisão absoluta

Colheita das amostras. Destas 13 propriedades, foram colhidas 251 amostras de leite de cabras das raças Alpina americana, Alpina Britânica, Anglo-Nubiana, Saanen, Parda

Alpina, Toggenburg e mestiços. Todas as propriedades apresentaram animais com histórico de queda brusca na produção de leite. Em quatro propriedades, foram observados animais com histórico de desordens reprodutivas. Para a coleta das amostras foi realizada lavagem dos tetos com solução de hipoclorito de sódio e os mesmos foram embebidos em álcool iodado. Posteriormente foi realizado um *pool* dos dois tetos, sendo colhida uma amostra de cada animal, em tubos do tipo Falcon estéreis contendo solução salina glicerinada a 50% adicionada de Penicilina (2.000UI/ml), acondicionadas em caixas de isopor com gelo e depois armazenadas em freezers a - 20°C e - 80°C até a realização do diagnóstico molecular.

Diagnóstico molecular. As amostras de leite foram aliqüotadas em volume de 300 µl e submetidas à extração do DNA genômico com o *kit* comercial “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA extraído foi avaliada em quantificador automático (Multiscan Go, ®ThermoScientific). A reação da PCR foi realizada com os oligonucleotídeos descritos por Tola et al. (1997), *Ma* (FS1 5'-AAAGGTGCTTGAGAAATGCC-3' e FS2 5'-GTTGCAGAAGAAAGTCCAATCA - 3'), que amplificam um fragmento de 375 pares de base do gene 16SRNA de *Mycoplasma agalactiae*. Para reação foi utilizado 8µL da PCR Mix LGC® 2X (LGC Biotecnologia®, Código 13-11250, Cotia, São Paulo, Brasil) contendo: 200mM de cada dNTP; 1,5mM de MgCl₂; *Taq* DNA Polimerase (0,5U) em concentração e tampão de reação adequados, (Tris-HCl pH: 8,5, KCl); oligonucleotídeos a 30 pmol; DNA genômico 8µL e água de PCR, totalizando um volume final de 25 µL de reação. O controle positivo da reação foi o isolado de Pernambuco Ma62 (BrPE62) e como controle negativo foi utilizado água de PCR. O perfil termico usado foi o mesmo descrito por Tola et al. (1997). As reações foram realizadas em termociclador Bioer XP Thermal Cycler® (Bioer Technology Corporation LTDA, Hangzhou, China). Os produtos da PCR foram corados com *Blue Green Loading Dye I*® (LGC Biotecnologia®, Código 13-15009.06, Cotia, São Paulo, Brasil) e submetidos a eletroforese em gel de agarose à 1,5%. Os amplicons visualizados em transiluminador (®*TransiluminatorLooccusBiotecnology L-Pix* photodocumented).

Análise dos Fatores de Risco e Estatística. Para o estudo dos fatores de risco foi aplicado questionário investigativo, constituídos por perguntas objetivas ao produtor, referentes às características gerais das propriedades, ao manejo produtivo, reprodutivo e sanitário.

Os dados foram expressos utilizando frequências absolutas e relativas. A interpretação da prevalência (alta, média e baixa) foi baseada nos percentis de 25 e 75 das porcentagens de animais positivos nos rebanhos. Em seguida, realizou-se uma análise de associação do histórico de manifestações clínicas nos rebanhos com o resultado obtido na PCR para *Mycoplasma agalactiae* por meio do teste de X^2 (Sampaio 1998). Para a análise dos fatores de risco associados à infecção, primeiramente, realizou-se uma análise univariada das variáveis de interesse através do teste de Qui-quadrado de Pearson (X^2) ou Exato de Fisher, quando necessário e, posteriormente, uma análise de regressão logística considerando como variável dependente o resultado obtido na PCR (positiva ou negativa). As variáveis independentes consideradas no modelo foram aquelas que apresentaram significância estatística inferior a 0,20. Essa probabilidade foi estipulada para que possíveis fatores de risco do evento não fossem excluídos da análise (Hosmer & Lemeshow 1989). O EpiInfoTM 7 foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos e o nível de significância adotado foi de 5,0%.

Procedimentos Éticos. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) sob o número de protocolo nº296-2015.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 251 amostras analisadas, 50 (19,9%; I.C. 15,1- 25,4%) foram positivas na PCR para *M. agalactiae*, com oito propriedades positivas (61,5%) distribuídas nos seguintes municípios: Gurjão, Juazeirinho, Prata, São Sebastião do Umbuzeiro e Zabelê.

As propriedades A, F e M tiveram elevadas prevalências; as demais propriedades apresentaram médias e baixas prevalências de ACOC, de acordo com os percentis de 25 e 75 (Figura 1). Na distribuição por municípios, observaram-se prevalências nos municípios de Juazeirinho (64,3%), São Sebastião do Umbuzeiro (40,0%), Prata (18,3%), Gurjão (16,7%) e Zabelê (12,5%). Nos municípios de Monteiro e Nova Floresta, todos os animais avaliados foram negativos para a infecção por *M. agalactiae*. Os resultados da análise dos fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* em caprinos e da associação da PCR com o histórico de sinais clínicos nos rebanhos, encontram-se nos Quadros 1 e 2.

A prevalência da ACOC neste estudo (19,9%) foi mais baixa que a encontrada por Azevedo et al. (2006) na Paraíba. Estes autores relataram uma prevalência de 100,0% em pequenos ruminantes após surto de agalaxia contagiosa em propriedades na

Paraíba. Possivelmente, os valores foram diferentes devido à ocorrência de surtos em várias propriedades estudadas pelos autores. Entretanto, quando comparado com estudo realizado por Bandeira et al. (2008), também no estado da Paraíba, verificou-se um prevalência mais alta em leite de cabras que a observada por este autor, que foi de 7,5% (9/120). Tal diferença pode ser atribuída ao número de animais e de rebanhos utilizados nos trabalhos, aquisição de animais de outras regiões do Brasil e diferenças de manejo entre propriedades, já que os estudos foram realizados em propriedades diferentes, apesar de alguns municípios terem sido os mesmos. No presente estudo, foi observada uma prevalência mais alta em leite de cabras que a verificada por Alves et al. (2013), no Estado de Pernambuco, que foi de 3,7% (3/81). Estes autores explicam que a diferença entre os valores de prevalência deve-se aos diferentes estágios da micoplasmose nos rebanhos estudados, além disso, afirmam que fatores como: caráter crônico ou subclínico da doença e tratamento das mastites em rebanhos com antibióticos por períodos prolongados, podem também contribuir para diferenças entre as prevalências. A presença do agente no leite é preocupante em relação a disseminação da enfermidade no rebanho.

Observou-se na análise dos fatores de risco associação para as variáveis: tamanho do rebanho ($P < 0,001$; OR=7,1; I.C. 2,4-20,6), reposição de animais da propriedade ($P < 0,001$; OR=4,7; I.C. 1,8-12,2) e participação dos animais em feiras e exposições ($P = 0,029$; OR=2,0; I.C. 1,0-3,9). Com relação ao tamanho do rebanho, os rebanhos que tinham entre 51 e 100 animais apresentaram mais chances de terem animais positivos que os rebanhos com até 50 animais (OR=7,1; I.C. 2,4-20,6).

Em rebanhos onde ocorre aquisição de animais para reposição do plantel existe um aumento de chances dos animais serem positivos para à infecção por *M. agalactiae* quando comparado a rebanhos fechados (OR=4,7; I.C. 1,8-12,2). Tal fato demonstra que quando os animais de reposição não são provenientes das propriedades, existe uma probabilidade maior de serem introduzidos animais positivos nos rebanhos, favorecendo a disseminação do agente. Al-Momani et al. (2008), em estudo realizado na Jordânia, verificaram que o agente pode ser introduzido por animais portadores de outros rebanhos usados para reprodução. Estes mesmos autores relataram que outros fatores podem contribuir para a ocorrência do agente nos rebanhos, tais como: limpeza inadequada dos utensílios de ordenha e separação dos animais jovens das mães.

A participação dos animais em feiras e/ou exposições aumentaram as chances de os animais se infectarem com *M. agalactiae* quando comparados aos animais

procedentes de rebanhos que não participavam destes eventos (OR=2,0; I.C. 1,0-3,9). Este resultado corrobora com o que foi relatado anteriormente por Bandeira et al. (2008), que afirmaram que os surtos de micoplasmose em caprinos na Paraíba e Pernambuco são decorrentes de participações em feiras e exposições e introdução de animais provenientes das regiões sudeste e centro-oeste do país. Estes autores afirmaram que a rápida disseminação de *M. agalactiae* e provavelmente outras infecções são favorecidas pelo intenso comércio e trânsito de animais dos Estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Tal fato é de extrema importância e contribui bastante para que a doença se espalhe nos rebanhos.

Em relação aos sinais clínicos associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae*, a maioria das variáveis apresentaram associação significativa com o diagnóstico da ACOC, exceto, a variável referente à distúrbios reprodutivos, infertilidade e infertilidade associada com aborto ($P>0,05$). Embora tenha ocorrido associação de casos de mastite não responsivas ao tratamento e poliartrite com o diagnóstico da infecção por *M. agalactiae*, não se pode afirmar que a presença destes sinais clínicos são indicativos de infecção por *Mycoplasma agalactiae*, embora outros agentes possam ocasionar estes mesmos sinais clínicos, assim como a presença do agente em amostras leite de caprinos não indica a ocorrência de infecção. Mesmo não ocorrendo uma associação entre os sinais clínicos de doença reprodutiva com à infecção por *M. agalactiae*, deve ser realizada uma investigação para descartar a possibilidade de infecção pelo agente. Vale ressaltar que são escassos estudos a respeito dos fatores de risco associados com a ocorrência de infecção por *Mycoplasma agalactiae*, sendo necessária a realização de mais pesquisas com o intuito de verificar outros fatores de risco que podem estar associados com a infecção por este agente.

CONCLUSÃO

Os resultados permitiram confirmar a ocorrência do *Mycoplasma agalactiae* em amostras de leite de caprinos da Paraíba. Os principais fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* foram: tamanho do rebanho, reposição de animais da propriedade e participação dos animais em feiras e/ou exposições. A identificação dos fatores de risco são imprescindíveis para a adoção de medidas de controle e para a correção dos fatores de manejo em propriedades que tenham animais com diagnóstico positivo, evitando assim, a disseminação do patógeno. Portanto, é necessário o monitoramento dos rebanhos caprinos leiteiros e a conscientização dos produtores rurais

para a importância econômica da doença, visto que a mesma acarreta severos prejuízos econômicos para os produtores.

REFERÊNCIAS

- Al-Momani W., Nicholas R.A.J. & Abo-Shehada M.N. 2008. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. *Prev. Vet. Med.* 83:1-10.
- Alves B.H.L.S., Silva J.G., Mota A.R., Campos A.C., Júnior J.W.P., Santos S.B. & Mota R.A. 2013. *Mycoplasma agalactiae* in semen and milk of goat from Pernambuco State, Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 33:1309-1312.
- Azevedo E.O. 2005. Aspectos clínico epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos(ACOC) no Brasil. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 87f.
- Azevedo E.O., Alcântara M.D.B., Nascimento E.R., Tabosa I.V., Barreto M.L., Almeida J.F., Araújo M.D'O., Rodrigues A.R.O., Riet-correa F. & Castro R.S. 2006. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Braz. J. Microbiol.* 37:576-581.
- Azevedo E.O., Silva N.S., Campos A.C., Cordeiro A.A., Mamede A.G., Silva R.B.S., Castro R.S., Nascimento E.R. & Marinho M.L. 2012. Congenital Infection of *Mycoplasma agalactiae* in Goat Kids. *Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM). XIX, Cicinatti.*
- Bandeira D.A., Castro R.S., Azevedo E.O., Nascimento E.R., Melo L.S.S. & Melo C.B. 2008. Infection by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat herds in the microregions of Cariri in Paraíba State, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60:1255-1258.
- Chazel M., Tardy F., Le Grand D., Calavas D. & Poumarat F. 2010. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet. Res.* 6:1-8.
- Gil M.C., Peña F.J., Mendoza H.J. & Gomez L. 2003. Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Vet. Med. B.* 50:484-487.

- Gómez-Martín A., Amores J., Paterna A. & De La Fe C. 2013. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. *The Vet. J.* 198:48-56.
- Hosmer D.W. & Lemeshow S. 1989. *Applied Logistic Regression*. John Wiley and Sons: New York. 241p.
- Madanat A., Zendulková D. & Pospíšil Z. 2001. Contagious agalactiae of sheep and goats: a review. *Acta Vet. Brno.* 70:403-412.
- Organização Internacional de Epizootias (OIE). 2013. Contagious Agalactia. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017*, 1-10. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.04_CON T_AGALACT.pdf>.
- Organização Internacional de Epizootias (OIE). 2014. Contagious Caprine Pleuropneumonia. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017*, 1-15. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.05_CCPP.pdf>.
- Sampaio I.B.M. 1998. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 221p.
- Santos L.M.M., Pereira C.S., Mansur F.J., Lopes L.A., Campos A.C., Azevedo E.O., Castro R.S., Barreto M.L., Almeida J.F., Nascimento E.R. *Mycoplasma agalactiae* Outbreak in Goat Herd of Rio de Janeiro State, Brazil. In: 20th Congress of the International Organization for Mycoplasma, Blumenau, 2014.
- Singh V.P., Srivastava N.C., Kumar M., Sunder M.J. & Varshney J.P. 2004. Isolation and characterisation of an Indian strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* type LC from a case of caprine arthritis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 4:273-284.
- Thrusfield M. 2004. *Epidemiologia Veterinária*. 2 ed. São Paulo: Roca, 572p.
- Tola S., Angioi A., Rocchigiani A.M., Idini G., Manunta D., Galleri G. & Leori G. 1997. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet. Mic.* 54:17-22.

Legendas de Figuras

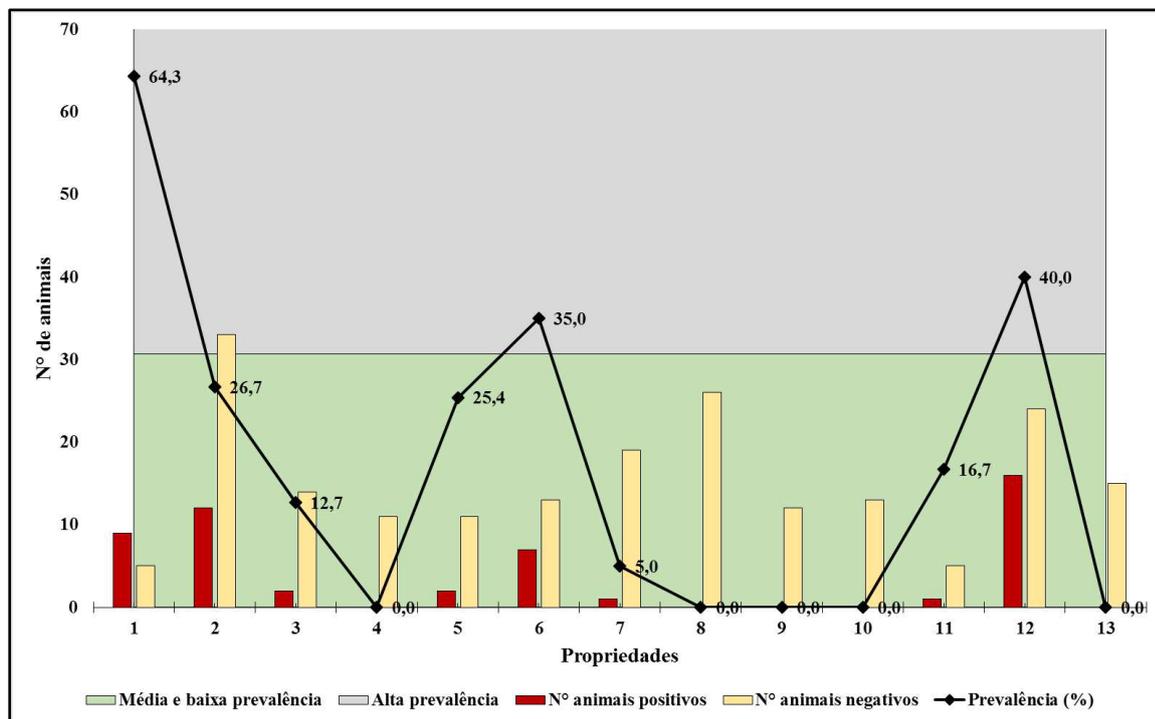
Figura 1. Frequência de caprinos positivos das 13 propriedades visitadas no estado da Paraíba.

Legendas dos Quadros

Quadro 1. Análise dos fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* em caprinos leiteiros do estado da Paraíba.

Quadro 2. Análise de associação dos resultados da PCR com o histórico de manifestações clínicas em caprinos leiteiros do estado da Paraíba.

Figura 1. Distribuição da prevalência nas 13 propriedades criadoras de caprinos leiteiros visitadas no estado da Paraíba, no período de março de 2016 a abril de 2017.



Quadro 1. Análise dos fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* em caprinos leiteiros da Paraíba.

Variáveis	N	PCR	Valor P	Regressão	Valor P ^(C)
		Positiva		logística OR (I.C. 95%)	
<i>Característica racial</i>					
Pura	226	46 (20,3%)	0,794 ^(A)		
Mestiça	25	4 (16,0%)			
<i>Tamanho do rebanho</i>					
Até 50 animais	65	4 (6,1%)	<0,001^{(B)*}	-	
Entre 51 e 100 animais	145	46 (31,7%)		7,1 (2,4-20,6)	<0,001*
Entre 101 e 200 animais	15	0 (0,0%)		**	
Acima de 200 animais	26	0 (0,0%)		**	
<i>Comedouros e bebedouros comuns para animais jovens e adultos</i>					
Sim	60	11 (18,3%)	0,724 ^(B)		
Não	191	39 (20,4%)			
<i>Controle de insetos</i>					
Sim	191	39 (20,4%)	0,724 ^(B)		
Não	60	11 (18,3%)			
<i>Limpeza das instalações</i>					
Sim	219	43 (19,6%)	0,767 ^(B)		
Semanalmente	32	7 (21,9%)			
<i>Animais de reposição são da propriedade</i>					
Sim	231	40 (17,3%)	<0,001^{(B)*}		
Não	20	10 (50,0%)		4,7 (1,8-12,2)	0,001*
<i>Linha de ordenha</i>					
Sim	196	34 (17,3%)	0,054 ^(B)		
Não	55	16 (29,1%)		1,9 (0,9 –3,9)	0,056
<i>Tratamento da mastite clínica</i>					
Sim	80	21 (26,2%)	0,086 ^(B)	1,7 (0,9 –3,3)	0,088

Não	171	29 (16,9%)			
<i>Destino dos animais doentes¹</i>					
Abate	20	10 (50,0%)	0,088 ^(B)	2,4 (0,8 –6,7)	0,091
Tratamento com antimicrobianos	65	19 (29,2%)			
<i>Animais participam de feiras e/ou exposições</i>					
Sim	65	19 (29,2%)	0,029^{(B)*}	2,0 (1,0 –3,9)	0,031*
Não	186	31 (16,7%)			

^(A) Teste do Exato de Fisher; ^(B) Teste X²; ¹ base de dados diferente (N=85); N – Total de Amostras; OR – *Odds Ratio*; I.C. – Intervalo de Confiança; *Associação significativa ao nível de 5,0%; ** Não foi possível calcular a OR.

Quadro 2. Análise de associação dos resultados da PCR com o histórico de manifestações clínicas em caprinos leiteiros da Paraíba.

Variáveis	N	PCR Positiva	Valor P ^(A)
<i>Histórico de mastite que não responde a antibioticoterapia</i>			
Sim	40	17 (42,5%)	<0,001*
Não	211	33 (15,6%)	
<i>Histórico de mastite e poliartrite ao mesmo tempo</i>			
Sim	40	17 (42,5%)	<0,001*
Não	211	33 (15,6%)	
<i>Histórico de nascimento de crias com poliartrite</i>			
Sim	20	10 (50,0%)	<0,001*
Não	231	40 (17,3%)	
<i>Histórico de pneumonias, poliartrite, conjuntivite, morte súbita</i>			
Sim	40	17 (42,5%)	<0,001*
Não	211	33 (15,6%)	
<i>Histórico de distúrbios reprodutivos</i>			
Sim	85	29 (34,1%)	<0,001*
Não	166	21 (12,6%)	
<i>Quais distúrbios reprodutivos¹</i>			
Infertilidade	65	19 (29,2%)	0,088
Infertilidade + aborto	20	10 (50,0%)	

^(A) Teste χ^2 ; N – Total de amostras analisadas; ¹ Base de dados diferente (N=85);

*Associação significativa ao nível de 5,0%.

CAPÍTULO III- Investigação Molecular de *Mollicutes* e Grupo *Mycoplasma Mycoides* (GMM) em amostras de pulmão de caprinos do estado da Paraíba, Brasil

O artigo foi submetido à Revista Tropical Animal Health and Production – ISSN 1573-7438 Qualis B1

Molecular Investigation of *Mollicutes* and *Mycoplasma Mycoides* Cluster (MMC) in lung samples of goats of Paraíba State, Brazil

Rodrigo Antônio Torres Matos³ · Sandra Batista dos Santos² · Milena Áquila Aragão Lira³ · José Wilton Pinheiro Júnior⁴ · Rinaldo Aparecido Mota² · Felício Garino Júnior¹

Abstract The present study aimed to investigate *Mollicutes* and the *Mycoplasma mycoides* cluster in lung samples of goats in the State of Paraíba, Brazil. For the diagnosis of *Mollicutes* and *Mycoplasma mycoides* cluster, 100 samples of lungs of crossbred goats, of different age groups, both sexes, with and without lung lesions from cities of the state of Paraíba were aseptically collected. Two to three fragments of the lungs of each animal were collected in sterile Falcon tubes for molecular diagnosis using Polymerase Chain Reaction (PCR). All the 100 analyzed lung samples tested PCR negative for *Mycoplasma mycoides* cluster and 3% (3/100) tested PCR positive for *Mollicutes*. Respiratory diseases of small ruminants caused by *Mycoplasma* species are becoming increasingly common in goats, but are underdiagnosed. In Brazil, there are no reports of respiratory problems, pneumonia or pleuropneumonia in goats caused by *Mycoplasma* spp., studies on the occurrence of these pathogens in goats with respiratory problems are needed to support the elaboration of measures to prevent the spread of respiratory diseases caused by these agents.

Keywords Respiratory disease · PCR · Goats.

Received in....

Accepted for publication...

¹ Microbiology Laboratory, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, s/n, Patos, PB 58708-110, Brazil. *Author for correspondence: rodrigomatmos@gmail.com

² Laboratory of Infectious-Contagious Diseases, Department of Veterinary Medicine, Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, 52171-900, Brazil.

³ Postgraduate Program in Veterinary Medicine, UFCG, Av. Universitária, s/n, Patos, PB, 58708-110, Brazil.

⁴ Veterinary Medicine Academic Unit, UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, 52171-900, Brazil.

Introduction

The *Mycoplasma* group is significantly associated with respiratory infections and other systemic infections in small ruminants. Pneumonia/pleuropneumonia can be caused by different mycoplasmal species, alone or in combination with other microorganisms. Pneumonia in small ruminants is a serious problem for this group of animals, which results in economic losses in several parts of the world (Nicholas et al., 2008).

Mycoplasmas, of the class *Mollicutes* are considered the smallest and simplest self-replicating bacteria, distinguished by the absence of a cell (Chazel et al., 2010). Specimens of the class *Mollicutes* can cause various diseases in animals and humans and are generally associated with pneumonia, conjunctivitis, arthritis, abortion and infertility (Nicholas, 2002).

In the class *Mollicutes*, it is worth mentioning the *Mycoplasma mycoides* cluster (MMC), a group of six closely related species of mycoplasma by their biochemical and serological characteristics and phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene. The species grouped in this cluster are known to cause several diseases in cattle, goats and sheep (OIE, 2008). The cluster includes the following species and subspecies: *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype SC (MmmSC), *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotype LC (MmmLC), *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp) and *Mycoplasma* sp. bovine group 7 (Msp7-PG50) (SANTOS et al, 2010).

Contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) is one of the most severe *mycoplasma* diseases. It is highly fatal and occurs in Eastern Europe, the Middle East, Africa and Asia (Awan et al., 2009, book). *Mycoplasma* infections can cause indirect economic loss due to weight loss and infertility of the animals. In Brazil, contagious agalactia (CA) caused by *Mycoplasma agalactiae* was detected in small ruminants. It is considered endemic in the Northeastern region of the country, and there are reports of cases in the Southeastern region (Azevedo et al., 2015). However, there are no reports of goats with respiratory disease caused by *Mycoplasma* spp. The present study aimed to investigate *Mollicutes* and the *Mycoplasma Mycoides cluster* (MMC) in lung samples from goats in the Brazilian state of Paraíba.

Materials and Methods

Sample collection

From March to April 2017, 100 samples of the lungs of crossbred goats of different age groups, both sexes, with and without lung lesions, from cities in the state of Paraíba were aseptically collected. Of the 100 samples analyzed, 95 were obtained from clinically healthy animals from the Patos Municipal Slaughterhouse and five were clinical samples of animals from different cities (Patos, Serra Branca, Coxixola), with clinical signs of respiratory disease that were necropsied in the Animal Pathology Sector of Veterinary Hospital of the Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) -CSTR-Campus de Patos. Two to three fragments of the lungs of each animal were collected in sterile Falcon tubes and stored in freezers at -20 °C. Subsequently, the samples were sent to the Laboratory of Infectious Diseases of Domestic Animals from Universidade Federal Rural of Pernambuco for molecular diagnosis using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique.

Molecular Diagnosis

Aliquots of 0.025µg of the samples were taken and stored for extraction of genomic DNA. The commercial kit "Wizard® Genomic DNA Purification Kit" (Promega) was used for DNA extraction, according to the manufacturer's protocol. PCR reaction for *Mollicutes* was performed with MGSO oligonucleotides (5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3 ') and GPO3 (5'-GGG AGC AAA AGC ATA GAT CCC TAG T - 3') with thermal profile previously described by Kuppeveld et al. (1992). For the reaction, 8µL of PCR Mix ® LGC 2X (LCG Biotechnologia, Código 13-11250, Cotia, Sao Paulo, Brazil) was used, which contained 200 mM of each dNTP; 1.5mM MgCl₂; Taq polymerase (0.5U) in appropriate concentration and reaction buffer (Tris-HCl pH: 8.5, KCl); Oligonucleotides at 30 pmol; 8µL genomic DNA and PCR water, in a final volume of 25 µL of reaction. A strain of *Mycoplasma mycoides mycoides* was used as positive control of the reaction (GM12, ATCC) and PCR water was used as negative control.

In PCR testing for *Mycoplasma mycoides* specific primers that amplify segments rmA and rmB, operons of gene 16S rRNA were used, with primers LPA-F (5'-

GAA ACG AAA GAT AAT ACC GCA TGT AG-3 ') and R-REAP (5' –CCA CTT GTG CGG GTC C CC GTC-3 ') (Pettersson et al., 1996a, Persson et al., 1999). PCR reaction consisted of 50mM KCL, 4mM MgCl₂, 10mM Tris-HCL pH 8.3; DNTPmix 0.8 mM, 5 pmol of each primer, 0.5U of AmpliTaq, 15µL of extracted DNA and 57µL of PCR water, in a total volume of 100µL. PCR water instead DNA was used for negative control in the reactions. Amplification was performed in 33 cycles of denaturation at 96° C for 30 sec, annealing at 60° C for 30 seconds and extension at 72° C for 1min. The reaction was preheated to 96° C for 3 minutes, and final extension at 72° C for 5min. The final reaction volume of 20µL consisted of 1x Tango buffer (33mM Tris-acetate pH 7.9, 10mM magnesium acetate, 66mM potassium acetate, 0.1g/mL BSA, 1mM DTT, 50% glycerol), 5U enzyme. PCR product was digested at 37° C for two hours with inactivation at 65° C for 20 min. The fragments obtained were visualized under UV light. Molecular weight marker 100pb DNA ladder (LGC ® Biotechnology, Code 13-4007-01) was used.

Results

All the 100 samples of lungs analyzed tested PCR negative *Mycoplasma mycoides* cluster and 3% (3/100) tested PCR positive for *Mollicutes*. There were no apparent lesions in the lungs of the 95 clinically healthy animals. The three animals tested PCR positive for *Mollicutes* showed progressive weight loss. Necropsy revealed bronchopneumonia with pleural involvement. One of the animals was diagnosed with caprine arthritis-encephalitis (CAE) using the agar gel immunodiffusion (AGID) test. All necropsied animals had a history of respiratory problems and suspected *Mycoplasma* in one case.

Discussion

Respiratory diseases have been one of the main obstacles to the production of small ruminants in tropical and temperate regions of the world (Ameh et al., 2000; Egwu et al., 2000). Contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) and other respiratory infections caused by *Mycoplasma* species have been recorded in several continents and countries (NICHOLAS et al., 2008). However, there are no reports of goats affected by such diseases in Brazil. The only reports in this country concern the occurrence of

Mycoplasma in animals with reproductive and respiratory disorders, mastitis, *agalactia* and *keratoconjunctivitis* (Nascimento et al., 1986; Muller et al., 1998; Azevedo, 2006; Buzinhani et al., 2007). Since 2001, cases of contagious *agalactia* with insulated *Mycoplasma agalactiae* have been described in the Northeastern state of Paraíba (Azevedo et al., 2015). In a study conducted in Paraíba, Bandeira et al. (2008), detected clinical signs of *agalactia*, claudication, emaciation and death, as well as fever, prostration, and anorexia in goatlings. Muller et al. (1998) isolated *Mycoplasma arginini* associated with *Trueperella (Actinomyces) pyogenes*, on a Suffolk sheep with pleuropneumonia symptoms. The present study identified three cases of infection by *Mollicutes*, demonstrating that the agent is present in goat herds in the state of Paraíba. Therefore, diagnosis of the respiratory disease is needed, and the agent involved in the disease etiology must be confirmed. No cases of infection by agents of the *Mycoplasma mycoides* cluster were detected. So, further studies are needed to check the presence of these agents in goat herds, particularly in the Northeastern region of Brazil where goat breeding is one of the main economic activities of the region.

Conclusion

Respiratory diseases of small ruminants caused by *Mycoplasma* species are becoming increasingly common in goats, but are underdiagnosed. In Brazil, there are no reports of respiratory problems, pneumonia or pleuropneumonia in goats caused by *Mycoplasma* spp. Therefore, studies on the occurrence of these pathogens in goats with respiratory problems are needed to support the elaboration of measures to prevent the spread of respiratory diseases caused by these agents.

Compliance with ethical standards All experimental procedures with goats were approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Campina Grande (CEP n°296-2015).

Conflict of interest The authors in this study declare that there is no conflict of interest.

References

- Adehan, R.K., Ajuwape, A.T.P., Adetosoye, A.I. and Alaka, O.O., 2006. Characterization of *Mycoplasmas* isolated from pneumonic lungs of sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 63, 44-49
- Ameh, J.A., Egwu, G.O. and Tijjani, A.N., 2000. Mortality in sahelian goats in Nigeria. *Preventive Veterinary Medicine*, 44, 107-111
- Buzinhani, M., Metiffogo, E. and Timenetsky, J., 2007. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59, 1368-1375
- Egwu, G.O., Ball, H.J., Rodriguez, F. and Fernadex, A., 2000. *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in agalactia syndrome of sheep and goats. *Veterinary Bulletin*, 70, 391-402
- Kuppeveld, V.F.J.M., Logt, J.T.M., Angulo, A.F., Zoest, M.J., Quint, W.G.V., Niesters, H.G.M., Galama, J.M.D. and Melchers, W.J.G., 1992. Genus- and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16 rRNA amplification. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 2606-2615
- Gonçalves, R., Mariano, I., Núñez, A., Branco, S., Fairfoul, G. and Nicholas, R., 2010. Atypical non-progressive pneumonia in goats. *The Veterinary Journal*, 183, 219-221
- Muller, E.E., Nascimento, E.R., Mettiffogo, E., Reis, A.C.F., Freitas, J.C. and Nascimento, M.G.F., 1998. Isolamento de *Mycoplasma arginini* e *Actinomyces pyogenes* de ovino com pleuropneumonia. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 20, 118-119
- Nascimento, E.R., Nascimento, M.G.F., Freund, E.A. and Andersen, H., 1986. Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. *Brazilian Veterinary Journal*, 142, 246-249
- Nicholas, R.A.J., 2002. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by *Mycoplasma*. *Small Ruminant Research*, 45, 145-149
- Nicholas, R., Ayling, R.D. and Mcauliffe, L., 2008. Contagious caprine pleuropneumonia. In: *Mycoplasma Diseases of Ruminants*. CABI. pp 114-131.
- Persson, A., Pettersson, B., Bolske, G. and Johansson, K.E., 1999. Diagnosis of contagious Bovine Pleuropneumonia by PCR-laser-induced fluorescence and PCR-

- restriction endonuclease analysis based on the 16SrRNA genes of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 3815-3821
- Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlén, M. and Johansson, K.E., 1996. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* Cluster as determined by sequence analysis of the 16SrRNA genes from the two rRNA operons. *Journal of Bacteriology*, 178, 4131-4142
- Ruragirwa, F.R. and McGuire, T.C., 2003. Contagious caprine pleuropneumonia: Diagnosis and control. Available online at <http://file://A:/Contagious#caprine#pleuropneumonia#Diagnosis #and#control.htm>, p. 8
- Santos, S.B., Nascimento, E.R., Faccini, J.L.H., Barreto, M.L., Almeida, J.F., Pereira, V.L.A. and Campos, C.A.M., 2010. Detection of *Mycoplasma mycoides* cluster by indirect immunoperoxidase (IPI) and PCR-REA in the ear canal of bovines. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30, 465-469

CONCLUSÕES GERAIS

As enfermidades infecciosas vêm se disseminando rapidamente entre os rebanhos caprinos leiteiros e muitas vezes não são instituídas medidas de controle e profilaxia nas propriedades, fato este que contribui para o aumento dos prejuízos econômicos e impactos negativos provocados por estas enfermidades nos rebanhos.

Portanto, deve-se realizar o monitoramento através de exames sorológicos e adoção de medidas de controle e profilaxia para conter os avanços da artrite encefalite caprina e da toxoplasmose, reduzindo a prevalência destas enfermidades. Em relação à agalaxia contagiosa, é necessário o acompanhamento dos rebanhos caprinos, visto que a mesma acarreta severos prejuízos econômicos. Os principais fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* foram: tamanho do rebanho, reposição de animais da propriedade e participação dos animais em feiras e/ou exposições. A identificação dos fatores de risco são imprescindíveis para a adoção de medidas de controle e para a correção dos fatores de manejo em propriedades com diagnóstico positivo, evitando assim, a disseminação do patógeno.

Em relação aos problemas respiratórios, pneumonia ou pleuropneumonia em caprinos causados por *Mycoplasma* spp, deve-se realizar mais estudos ou pesquisas para monitoramento destes agentes em caprinos com problemas respiratórios, tendo como objetivo a adoção de medidas de controle para impedir a disseminação de doenças respiratórias causadas por estes agentes.

ANEXOS

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Objetivos e política editorial

A Revista Brasileira de Medicina Veterinária (RBMV) é uma publicação trimestral e multidisciplinar, da Sociedade de Medicina Veterinária do Estado do Rio de Janeiro (SOMVERJ) (www.somverj.org.br), que tem como objetivo publicar os resultados de trabalhos de pesquisa originais em todos os campos da Medicina Veterinária, visando o aprimoramento técnico-científico e profissional.

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por e-mail, de preferência na versão mais recente do Word, ao Prof. Carlos Wilson Gomes Lopes, Editor da Revista Brasileira de Medicina Veterinária (www.rbmv.com.br), Av. Presidente Vargas, 446/1004, CEP 20085-900, Rio de Janeiro, RJ ou por via eletrônica, através do e-mail: lopes,rbmv@gmail.com. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Comitê Editorial, apoiado pela Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares, peer review, e são de inteira responsabilidade dos autores. O autor para correspondência (*) fica responsável pelo manuscrito perante a revista.

Os trabalhos devem ser organizados, sempre, em TÍTULO, TÍTULO EM INGLÊS, AUTORES, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinações destes dois últimos), AGRADECIMENTOS e REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Os relatos de casos devem constar sempre de TÍTULO, TÍTULO EM INGLÊS, AUTORES, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, HISTÓRIO, DISCUSSÃO E/OU CONCLUSÃO E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. Em relatos de casos, o texto deve ser organizado, sempre, em INTRODUÇÃO, HISTÓRICO (Este deve ser constituído por Anamnese, material e métodos, e resultados), DISCUSSÃO E/OU CONCLUSÃO

ABSTRACT: deverá ser apresentado com os elementos constituintes do Resumo em português, podendo ser mais extenso. Ao final devem ser relacionadas às “KEY WORDS”;

RESUMO: deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português do trabalho, deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO. Ao final, devem ser relacionadas às“PALAVRAS-CHAVE”;
INTRODUÇÃO: deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;
MATERIAL E MÉTODOS: devem ser reunir os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local. As citações incluídas no rodapé deverão ser indicadas por ordem alfabética

RESULTADOS: deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; Tabelas devem ser preparadas sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em tabelas extensas;

DISCUSSÃO: os resultados devem ser discutidos diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

CONCLUSÕES: devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

AGRADECIMENTOS: devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: só incluirá a lista da bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta; deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores (em caixa alta e baixa), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra.

Exemplos:

Artigo Científico

Carrington S.D., Bedford P.G.C., Guillon J.P. & Woodward E.G. Polarized light biomicroscopic observations on the pre-corneal tear film.³ The normal tear film of the cat. J. Small Anim. Pract., 28:821-826, 1987.

Artigo Eletrônico

COBEA, Legislação & ética. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/ética.htm>>.

Acesso em: 14 Mar, 2007.

Livro

Rodrigues H. Técnicas anatômicas. 2ª ed. Vitória, Arte Visual, 1998. 200p. Capítulo de

Livro

Strubbe A.T. & Gelatt K.N. Ophthalmic examination and diagnostic procedures, p.427-466. In: Gelatt K.N. (Ed.), Veterinary Ophthalmology. 3rd. ed. Philadelphia, Lipincott Willians & Wilkins, 1999.

Teses (Somente serão aceitas as que estiverem disponíveis em sites eletrônicos e os mesmos devem ser indicados no final da citação)

Abraão D.C. Surto por Trypanosoma vivax em rebanho bovino leiteiro em Minas Gerais: Aspectos Epidemiológicos e Clínicos. Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

83p. (Disponível em: < http://www.icb.ufmg.br/icb/index.php/pos-rad.html/150.164.27.227/diss_defesas_detalhes.php?aluno=338>)

Resumos de reuniões científicas

Não serão aceitos.

Revisões

Somente a convite do Editor.

Suplementos e Números Especiais

Somente após aprovação do comitê editorial.

Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

Os nomes dos autores no manuscrito não deverão ser citados de forma abreviada e sim na íntegra.

Os trabalhos devem ser impressos em uma só face do papel, com margens de, no mínimo, 2,5cm e paginação na parte superior externa da página. As chamadas de rodapé devem ser digitadas após as "KEY WORDS" do ABSTRACT, sem uso da caixa de diálogo "Cabeçalho e rodapé". A formatação do original a ser submetido para publicação deve seguir o exemplo de apresentação do último fascículo da revista. O texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e as Tabelas no final. As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Devem ser introduzidos no texto do trabalho, através da ferramenta "Inserir" do Word, (imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade);

A redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. Abstract e Resumo serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

No rodapé da primeira página deverá constar título Profissional, maior título acadêmico se houver, endereço profissional completo do(s) autor(es), E-mail do autor para correspondência e dos demais autores;

Siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

Citações bibliográficas no texto serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, e ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais, em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo quando escaneadas pelo autor. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em dispositivos (“slides”) coloridos. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações); na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores. Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, e serão apresentadas no final do trabalho. As Tabelas deverão ser explicativas por si mesmas e colocadas no final do texto. Cada uma terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando de a em cada Tabela; as notas serão lançadas logo abaixo da Tabela respectiva, da qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

Encargos

Quando pelo menos um dos autores for Médico-veterinário e sócio da SOMVERJ ou assinante da Revista Brasileira de Medicina Veterinária (por morar fora do Rio de Janeiro ou no Exterior), os artigos serão aceitos sem taxas extras. Caso isso não ocorra, será cobrada a taxa de R\$ 300,00 reais, ou U\$ 150,00 do Exterior, por trabalho.



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Objetivo e política editorial

ISSN 0100-736X *versión*

impresa

ISSN 1678-5150 *versión*

online

Objetivo e política editorial

Os artigos devem ser submetidos através do Sistema Scholar One, link <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-cielo>>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponíveis no ato de submissão e no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outro periódico.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob a forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do artigo enviado. Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos artigos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os artigos submetidos são avaliados pelos pares (peer review) e, aceitos para publicação, com dois pareceres favoráveis ou rejeitados, por dois pareceres desfavoráveis

Os direitos autorais dos artigos aceitos para publicação permanecem com os autores.

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista é

cobrada taxa de publicação (paper charge) no valor de R\$ 1.500,00 por artigo editorado, na ocasião do envio da comunicação de aceite, ao autor para correspondência. Não há taxa de submissão e avaliação de artigo.

1. Os artigos devem ser organizados em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente abreviar seus nomes quando compridos**, mas mantendo o primeiro nome e o último sobrenome por extenso, como por exemplo: Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto (inverso, Peixoto P.V.); Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa (inverso, Riet-Correa F.). **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores;**

c) o **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO em português, podendo ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que incluem palavras do título;

d) o **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem palavras do título;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do artigo;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que

permitam a repetição da experimentação por outros pesquisadores. Em experimentos com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. **Quadros** (em vez de Tabelas) devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente expressar dados complexos, por gráficos (=Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no artigo e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido dos demais autores (todos), em caixa alta e baixa, do ano, do título da publicação citada, e, abreviado (por extenso em casos de dúvida), o nome do periódico ou obra, usando sempre como exemplo os últimos fascículos da revista (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) A digitação deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens**(superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das Figuras no final (logo após as **REFERÊNCIAS**). As Figuras e os Quadros devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Os nomes científicos devem ser escritos por

extenso no início de cada capítulo.

b) a redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, **sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word**. Todos os Quadros e todas as Figuras têm que ser citados no texto. Estas citações serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, em ordem crescente. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não devem conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores (na língua do país dos autores), o e-mail do autor para correspondência e dos demais autores**. Em sua redação deve-se usar vírgulas em vez de traços horizontais;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no artigo, serão colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois, e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois artigos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano. **Artigos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do artigo que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es).

Nas citações de artigos colocados cronologicamente entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**, como por exemplo: (Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada em **caixa alta e baixa**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. Os gráficos (=Figuras) devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área do gráfico (=Figura); evitar-se-á o uso de título ao alto do gráfico (=Figura).

4. **As legendas explicativas das Figuras devem conter** informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, independente do texto). 5. **Os Quadros devem ser** explicativos por si mesmos. Entre o título (em negrito) e as colunas deve vir o cabeçalho entre dois traços longos, um acima e outro abaixo. **Não há traços verticais, nem fundos cinzas**. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Caixa Postal 74.591

23890-000, Seropédica

Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Tel./fax: +55 (21) 2682-1081



pvb@pvb.com.br

Tropical Animal Health and Production

Instructions for Authors

Close

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper
- It is the responsibility of the corresponding authors that the names, addresses and affiliations of all authors are correct and in the right order, that institutional approvals have been obtained and that all authors have seen and agreed to a submission. This includes single authorship papers where appropriate. If at all in doubt please double check with eg. Supervisors, line managers department heads etc.

Types of articles

Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence.

Regular Articles: Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the journal including illustrations and tables. Articles should be structured into the following sections;

(a) Abstract of 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be presented as a single continuous paragraph without subdivisions.

(b) Introduction stating purpose of the work

(c) Materials and Methods

(d) Results

(e) Discussion (conclusions should be incorporated in the discussion!)

(f) Acknowledgements

(g) Statement of Animal Rights

(h) Conflict of Interest Statement

(i) References

Short Communications and Technical Notes: Short Communications and Technical Notes should not normally exceed approximately 2000 words or about 4 pages of the journal, including illustrations, tables and references. An abstract of 150-250 words should be included and a minimum number of sub-headings may be included if it adds clarity to the article.

Short Communications report original scientific data.

Technical Notes describe innovative methodologies.

Reviews: Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the Editor-in-Chief in advance.

Correspondence: Letters on topics relevant to the aims of the Journal will be considered for publication by the Editor-in-Chief who may modify them.

It is the authors responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and free sample articles on the springer.com journal homepage.

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Costs of Color Illustrations

Online publication of color illustrations is always free of charge.

For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

Title page

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)

- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Please note:

Use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document.

References

- 1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list.
- 2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that 'This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 12--16)'
- 3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references.
- 4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with co-authors.

Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc.

- 5. Use the following system for arranging each reference in the list:
 - For journal articles:
Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245--268
 - For books:
Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London)
 - For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multi-author books:
Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 68--79
 - For unpublished theses, memoranda etc:
Crowther, J., 1980. *Karst water studies and environment in West Malaysia*, (unpublished PhD thesis, University of Hull)
 - For Online documents:
Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. http://www.rsc.org/dose/title_of_subordinate_document. Accessed 15 Jan 1999
- 6. Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references.
- 7. Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in non-Latin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added.
- 8. Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

Tables

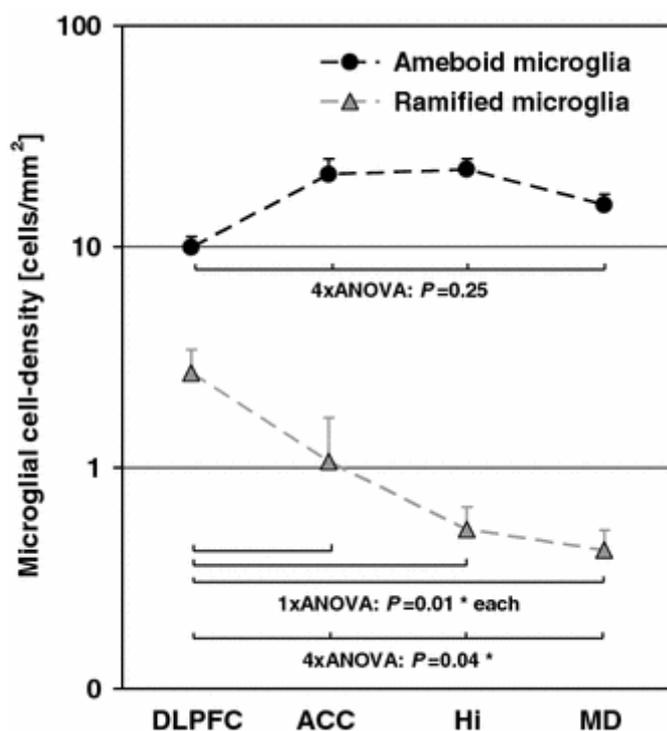
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

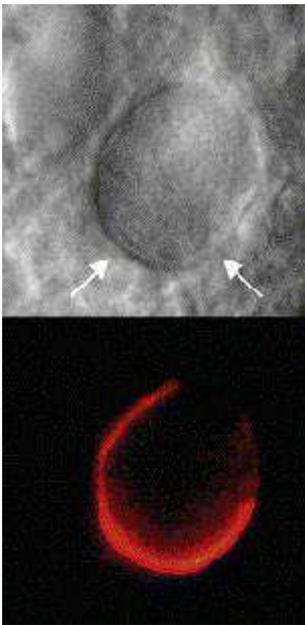
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



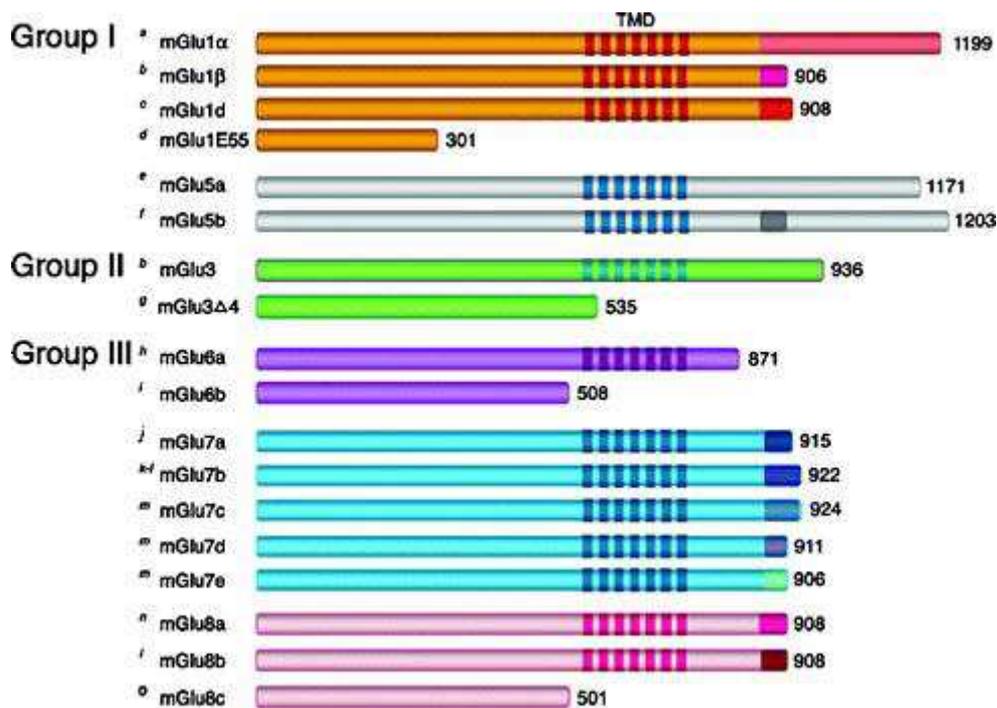
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will

not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxfl, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not accepted after** acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.
- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- The author's institution may be informed.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled “Compliance with Ethical Standards” when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor

- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

- [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants and/or animals

1) Statement of human rights

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

The following statements should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.”

For retrospective studies, please add the following sentence:

“For this type of study formal consent is not required.”

2) Statement on the welfare of animals

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists).

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

Ethical approval: “All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.”

If applicable (where such a committee exists): “All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.”

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements:

“This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors.”

“This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.”

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer’s web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

- Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

- Find more about the license agreement

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts.
- English language tutorial
- Nature Research Editing Service

- American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

.

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作，您需要确保您的英语语言质量足以令人理解。如果您需要英文写作方面的帮助，您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。
- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。

-

使用专业语言编辑服务，编辑人员会对英语进行润色，以确保您的意思表达清晰，并识别需要您复核的问题。我们的附属机构 Nature Research Editing Service 和合作伙伴 American Journal Experts 即可提供此类服务。

- 教程
- Nature Research Editing Service
- American Journal Experts

请注意，使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件，同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受，在发表之前，我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

.

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

・英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかをチェックしてもらおう。

・英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。

・プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語を向上させます。Nature Research Editing Service と American Journal Experts の2つは弊社と提携しているサービスです。

- 英語のチュートリアル
- Nature Research Editing Service
- American Journal Experts

英文校正サービスの利用は、このジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されますと、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います。

영어 원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음의 사항들을 고려하여 주십시오:

- 귀하의 원고의 표현을 명확히 해줄 영어 원어민 동료를 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.
- 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주하는 실수들을 확인합니다.
- 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. Nature Research Editing Service와 American Journal Experts에서 저희와 협약을 통해 서비스를 제공하고 있습니다.

- 영어 튜토리얼 페이지
- Nature Research Editing Service
- American Journal Experts

영문 교정 서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어 리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판 전 저희측 편집자에 의해 원고의 철자 및 문체를 검수하는 과정을 거치게 됩니다.



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Comissão de Ética em Pesquisa
Av. Sta Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos,
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3045



A: Sr. Rodrigo Antônio Torres Matos (Coordenador)

Protocolo CEP nº 296 - 2015

CERTIDÃO

Certificamos a V.Sa. que seu projeto intitulado **“Ocorrência de Mycroplasma spp. E avaliação de Métodos de diagnóstico para a detecção do Agente em Caprinos e Ovinos do Estado da Paraíba”** teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno deste comitê e foi Aprovado, em reunião Ordinária nº 02/2016, em 06 de Dezembro de 2016, estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações para a pesquisa científica.

Patos, 15 de Março de 2017.

Maria de Fátima de Araujo Lucena

Coordenadora do CEP

Monitoramento da Agalaxia Contagiosa

Questionário Epidemiológico

Nome da Propriedade:

Município:

Proprietário:

Estado:

Endereço:

Telefone: _____

Email: _____ Data: ___ / ___ / _____

Questionário nº _____ Investigador: _____

1. Raça (CAPRINOS):

(OVINOS):

1. Saanen ()

8. Santa Inês ()

2. SRD ()

9. Dorper ()

3. Toggenburg ()

10. SRD ()

4. Nubiana ()

11. Morada Nova ()

5. Anglo-Nubiana ()

12. Carotá ()

6. Murciana ()

13. Mestiços/ Outros _____

7. Mestiços/Outros

2. Sexo: F ()

M ()

Idade: _____

3. Material coletado: Sangue () Leite () Sêmen () Suabe vaginal ()

Suabe prepucial (.....) Líquido Articular () outros _____

4. Tipo de criação: Intensiva () semi-intensiva () Extensivo ()

5. Tipo de exploração: carne () leite () mista ()

6. Qual o tamanho do rebanho?

- a) Abaixo de 50 animais b) Entre 51 e 100 animais c) Entre 101 e 200 animais
d) Acima de 200 animais

MANEJO NUTRICIONAL E SANITÁRIO DO REBANHO**1. Suplementa a alimentação:**

- a) Sim b) Não

2. Fonte Hídrica:

- a) Parada b) Corrente c) Parada + Corrente

3. Qual o tipo de alimentação?

- a) Capim b) Feno c) Ração d) Palma e) **Outra** _____

4. Mineralização:

- a) Sim b) Não

5. Utiliza rotação de pastagem?

- a) Sim b) Não

6. Existe criação consorciada?

- a) Sim **Qual?** _____ b) Não

7. Os comedouros/bebedouros são comuns para jovens e adultos?

- a) Sim b) Não

8. Existe contaminação de fezes nos alimentos e água fornecidos aos animais independente da idade?

- a) Sim b) Não

9. Assistência Veterinária ?

- a) Não b) Permanente c) Temporária/Esporádica

10. Vacinação?

- a) Sim () b) Não () **Qual?**

11. Realiza controle de insetos ? (carrapatos, moscas etc.)

- a) Sim b) Não

12. Realiza limpeza das instalações ?

- a) Sim () Semanalmente () De 15 em 15 dias () Mensalmente () b) Não ()

13. Os animais para reposição são provenientes da propriedade?

a) Sim b) Não

14. Quando importa animais realiza quarentena?

a) Sim b) Não

15. Na aquisição de animais realiza exames?

a) Sim b) Não Qual? _____

16. Realiza alguns desses procedimentos na rotina da propriedade?

a) Brincagem b) Tatuagem c) Descorna d) Castração

17. Na realização desses procedimentos é realizada a desinfecção dos instrumentos?

a) Sim b) Não

18. Os cabritos são alimentados com colostro?

a) Sim b) Não

19. Realiza limpeza do úbere antes do fornecimento do colostro?

a) Sim b) Não

20. O colostro sofre algum tratamento térmico antes de ser fornecido ?

a) Resfriamento b) Congelamento c) Aquecimento térmico d) Não

MANEJO DA ORDENHA

1. Nº total de cabras/ovelhas do rebanho

2. Nº de cabras/ovelhas em lactação

3. Produção média por cabra

4. Produção leite/dia (litros)

a) 1-2 L b) até 3L c) até 5L b) Mais de 5L

5. Tipo de ordenha ?

a) Manual b) Mecânica canalizada

6. Cabras com até a 3ª lactação (%)

a) 0 a 59 b) Entre 60 e 79 c) Entre 80 e 100

7. Linha de ordenha ?

a) Sim b) Não

8. Teste da caneca telada?

a) Sim b) Não

9. Lavagem dos tetos antes da ordenha?

a) Sim b) Não

10. Secagem dos tetos após a lavagem?

a) Sim b) Não

11. Processo de secagem dos tetos após a lavagem

a) Papel comum b) Papel toalha c) toalha de pano

12. Anti-sepsia dos tetos antes da ordenha?

a) Sim b) Não

13. Anti-sepsia dos tetos após da ordenha?

a) Sim b) Não

14. Alimentação durante a ordenha?

a) Sim b) Não

15. Imersão das teteiras entre as ordenhas de animais (ordenha mecânica)?

a) Sim b) Não

16. Tratamento de mastite clínica?

a) Sim b) Não

17. Os animais que apresentam sinais clínicos de mastite ficam juntos com outros animais?

a) Sim b) Não

18. Os tratadores que lidam com esses animais doentes lidam com o restante do rebanho?

a) Sim b) Não

19. Faz uso de antimicrobianos para tratar mastites?

a) Sim b) Não

20. Histórico de mastites que não respondem ao uso dos antimicrobianos usados?

a) Sim b) Não

21. Faz rodízio do uso de antibióticos no tratamento das mastites?

a) Sim b) Não

22. Histórico na propriedade de mastites associada à poliartrite no rebanho?

a) Sim b) Não **OBS:** _____

23. Já teve algum caso de cabras com poliartrite?

a) Sim b) Não

24. Histórico de queda drástica na produção de leite em algum animal?

a) Sim b) Não

25. Histórico de mastite crônica que não responde ao tratamento?

a) Sim **Quantos animais ?** _____ b) Não

26. Histórico de cabritos neonatos com pneumonias, poliartrites, fraqueza ou morte súbita? a) Sim **Quantos animais?** _____ b) Não

OBS: _____

MANEJO REPRODUTIVO

1. Qual o tipo de manejo reprodutivo utilizado na propriedade?

a) Monta Natural b) Inseminação artificial c) Transferência de embriões

2. Se realiza Inseminação artificial, o sêmen é acompanhado de atestados sanitários?

a) Sim b) Não

3. Realiza exames para diagnóstico de gestação?

a) Sim **Quais?** _____ b) Não

4. Existe histórico de distúrbios reprodutivos na propriedade?

a) Sim b) Não

5. Quais distúrbios reprodutivos?

a) Infertilidade b) Abortos c) Vulvovaginite d) corrimentos vaginal purulento

e) Nascimentos de crias fracas f) Repetição deaios g) **Outros:**

6. Qual a idade dos animais que apresentaram algum desses sinais?

- a) 1 ano b) Entre 1 a 3 anos c) > 3 anos

7. Qual o destino dos animais que apresentam sintomatologia?

- a) Abate b) Comércio c) Tratamento com antibióticos