



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOGÊNICO DE VACINAS INATIVADAS
CONTRA AGALAXIA CONTAGIOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

ALINE ANTAS CORDEIRO

PATOS - PB

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOGÊNICO DE VACINAS INATIVADAS
CONTRA AGALAXIA CONTAGIOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Autora: Aline Antas Cordeiro

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcia Almeida de Melo

PATOS - PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

C794a Cordeiro, Aline Antas
Avaliação do perfil imunogênico de vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa / Aline Antas Cordeiro. – Patos, 2013.
49 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo”
“Coorientação: Prof. Dr. Edisio Oliveira de Azevedo”

Referências.

1. Adjuvante. 2. Imunoblotting. 3. *Mycoplasma agalactiae*.
4. Pequenos Ruminantes. I. Título.

CDU 614.9

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE PATOS-PB

ALINE ANTAS CORDEIRO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIGÊNICO DE VACINAS INATIVADAS CONTRA
AGALAXIA CONTAGIOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Marcia Almeida de Melo - UFCG
(Orientadora)

Prof^o Dr. Edisio Oliveira de Azevedo - UFSE
(Co-orientador)

Prof^o Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento - UFF
(1^o Membro)

Prof^a Dr.^a Maria das Graças Xavier de Carvalho - UFCG
(2^o Membro)

*Aos meus amados pais Luciene e
Francisco e meus queridos irmãos
Aran, Alvan e Adônís
Amores da minha vida.*

Dedico

“Mudaram as estações. Nada mudou. Eu sei que. Alguma coisa
aconteceu. Está tudo assim. Tão diferente...

Se lembra quando a gente. Chegou um dia a acreditar. Que tudo era
prá sempre. Sem saber. Que o prá sempre. Sempre acaba...

Mas nada vai. Conseguir mudar. O que ficou. Quando eu penso em
alguém. Só penso em você. E aí, então, estamos bem...

Mesmo com tantos motivos. Prá deixar tudo como está. Nem desistir,
nem tentar. Agora tanto faz. Estamos indo

De volta prá casa...”

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus diariamente pelo dom vida, pela minha família, pela vontade de viver, pelo conforto nos momentos mais difíceis desta caminhada, que não foram poucos.

A minha mãe Luciene “in memoriam” por ter me dado a vida, uma educação, pelo carinho, pela amizade e pelo incentivo para que eu chegasse aonde cheguei. Ela foi o amor da minha vida, viverá para sempre em coração, sentirei eternas saudades.

Ao meu pai Francisco pela existência, pela força, por ter sempre primado pelos meus estudos, pelos bons conselhos e por está sempre ao meu lado.

Aos meus queridos irmãos Aran, Alvan e Adônis, por serem meus melhores amigos, pelo cuidado comigo, pelo apoio e pelo carinho. Amo muito vocês.

A todos meus familiares, tios e tias, primos e primas, avôs, que me incentivaram a continuar, além do apoio e conforto nos momentos que mais precisei.

Ao meu noivo Aldenir por sua companhia, seu carinho, sua compreensão e pela enorme ajuda, não só neste trabalho, mas em todos os momentos da nossa vida.

A família Cavalcanti Lima por me acolherem muito bem, em especial a dona Josefa Pereira por ser minha segunda mãe.

Ao prof. Dr. Edisio Oliveira Azevedo pela orientação, apoio, paciência e amizade, foi bom trabalhar com o senhor.

A Ana Claudia Campos pela orientação, apoio, conhecimentos compartilhados, pelas amostras cedidas para este trabalho, pela companhia e amizade.

A prof.^a Dr.^a Marcia Almeida de Melo por compartilhar o seu conhecimento, pelos bons conselhos, pela paciência e orientação na execução dos trabalhos, por tornar tudo possível.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Vacinas e Diagnóstico da UFCG Aline Guedes, Natanael Silva, Raizza Barros, Ana Campos, Dêvede Silva e Leonardo Alves pela ajuda, companheirismo e amizade.

A minha amiga Aline Guedes pela força, companhia, conselhos, carinho e consideração. Sua presença foi fundamental para o término deste mestrado.

A minha amiga Maria Kelly por todos os bons momentos vividos, pelos conselhos, pelo carinho e pela amizade de longas datas.

As minhas amigas Anielle, Iana, Cristiane e Aline pela longa jornada trilhada juntas, pela nossa amizade. Espero que estejam felizes nos seus caminhos escolhidos.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido da UFCG Luciana, Fernanda, Herta, Heitor, Tereza Rotondano, Expedito Camboim por todo incentivo e apoio durante o experimento. Em especial a Luciana que me apoiou, sofreu comigo e tornou-se uma grande amiga.

Ao pessoal da Vigilância Sanitária Municipal de Patos, meus amigos e companheiros, Luedja Carla Gomes, Saula Virgínia Confessor, Silvia Helena Bastos, João Marcelo Vasconcelos, Fabrício Tavares e Giuliana Amélia Freire, pelo prazer de suas companhias todos os dias e pela amizade construída e fortalecida cada dia.

A todos os professores da UFCG pelos conhecimentos concedidos que contribuíram para minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande.

A CAPES pela bolsa de estudos.

Aos queridos animais que tornaram tudo isso possível.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
3 CAPÍTULO I: Avaliação do perfil imunogênico de vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa em caprinos.....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	16
Material e Métodos.....	17
Resultados e Discussão.....	19
Conclusões.....	22
Referências.....	22
4 CAPÍTULO II: Avaliação do perfil imunogênico de vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa em ovinos.....	25
Resumo.....	26
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material e Métodos.....	29
Resultados e Discussão.....	31
Conclusão.....	33
Referências.....	33
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
6 ANEXOS.....	39

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Pág.

- Figura 1 -** SDS-PAGE de proteína total de *M. agalactiae* corado com Comassie blue. Numeração à esquerda: peso molecular; Numeração à direita: pesos moleculares das proteínas de *M. agalactiae*. **19**
- Figura 2 -** Imunoblotting de proteína total de *M. agalactiae* utilizando soros de caprinos vacinados com as vacinas experimentais 1 (A), 2 (B) e 3 (C). A numeração na fita corresponde aos dias após a 1ª dose da vacinação: 1: 1ª dose da vacina; 2: 21 dias pós-vacinação; 3: 35 dias pós-vacinação; 4: 90 dias pós-vacinação; 5: 150 dias pós-vacinação; 6: 210 dias pós-vacinação; 7: 270 dias pós-vacinação e 8: 360 dias pós-vacinação. Os pesos moleculares das proteínas em kDa estão indicados à esquerda. **20**

CAPÍTULO II

- Figura 1 -** Imunoblotting de proteína total de *M. agalactiae* utilizando soros de ovinos vacinados com as vacinas experimentais 1 (A), 2 (B) e 3 (C). A numeração na fita corresponde aos dias após a 1ª dose da vacinação: 1: 1ª dose da vacina; 2: 21 dias pós-vacinação; 3: 35 dias pós-vacinação; 4: 90 dias pós-vacinação; 5: 150 dias pós-vacinação; 6: 210 dias pós-vacinação; 7: 270 dias pós-vacinação e 8: 360 dias pós-vacinação. Os pesos moleculares das proteínas em kDa estão indicados à direita. **37**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta de anticorpos anti- proteínas de superfície de *M. agalactiae* em caprinos e ovinos vacinados com vacina inativada constituída de antígeno total de *M. agalactiae* isolado no Brasil. A vacina 1 foi adsorvida em hidróxido de alumínio, a vacina 2 em Montanide IMS-2215-VG e a vacina 3 em Montanide Gel-01. O pool de soros provenientes de dez caprinos e dez ovinos coletados nos períodos 0, 21, 35, 90, 150, 210, 270 e 360 dias pós-vacinação foram testados pela técnica de *Western blotting*. Nos caprinos, as vacinas 1 e 2 apresentaram melhores resultados. Os anticorpos foram observados 21 dias após a primeira dose para as três vacinas. Em relação ao perfil das proteínas, a vacina 1 estimulou a produção de anticorpos contra as proteínas P48 e P55 e a vacina 2 contra a P48 e a P80. Nos ovinos, a vacina 2 foi mais antigênica, com detecção de anticorpos 21 dias após a primeira dose. Para as vacinas 1 e 3, os anticorpos são verificados após 35 dias, com queda acentuada aos 90 dias; apenas anticorpos contra a P48 apareceram após a terceira dose de forma discreta. Contra a vacina 2, ainda persistiram anticorpos contra a P48, P55 e P80 nos períodos 90, 150 e 210, que aumentaram após a terceira dose. Estes resultados reforçam a possibilidade de controle da agalaxia contagiosa utilizando a vacinação e sugere a possível utilização da proteína P48 em testes diagnósticos e vacinas no Brasil.

Palavras-chave: Adjuvante, imunoblotting, *Mycoplasma agalactiae*, pequenos ruminantes, vacina.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the response of antibodies to surface proteins of *M. agalactiae* in sheep and goats vaccinated with inactivated vaccine consists of total antigen of *M. agalactiae* isolated in Brazil. Vaccine 1 - antigen adsorbed onto aluminum hydroxide; Vaccine 2 - antigen adsorbed onto Montanide IMS-VG-2215, and Vaccine 3 - antigen adsorbed onto Montanide Gel-01. The pool of sera from ten goats and ten sheep collected in periods 0, 21, 35, 90, 150, 210, 270 and 360 days after the first vaccination were tested by Western blotting techniques. In goats, vaccines 1 and 2 showed better results. The antibodies were observed 21 days after the first dose for all three vaccines. Regarding the profile of proteins in vaccine 1 stimulated the production of antibodies against proteins P48 and P55 and the vaccine 2 against P48 and P80. In sheep, the vaccine 2 was more antigenic with antibodies 21 days after the first dose. For both vaccines 1 and 3, antibodies were present 35 days after first dose, with a significant drop at 90 days, only antibodies against P48 discreetly appeared after the third dose. Stimulation induced by vaccine 2 produced antibodies against P48, P55 and P80 proteins that persisted until 90, 150 and 210 days after first dose, which rose again after third dose. These results reinforce the possibility of control of contagious agalactia using vaccination and suggest the possible use of P48 protein in diagnostic tests and vaccines in Brazil.

Key words: Adjuvant, immunoblotting, *Mycoplasma agalactiae*, small ruminants, vaccine.

INTRODUÇÃO GERAL

A agalaxia contagiosa (AC) é uma doença emergente no Brasil. Seu diagnóstico clínico foi primeiramente realizado em julho de 2001, em um rebanho caprino leiteiro situado no município de Soledade, Estado da Paraíba. *Mycoplasma agalactiae* foi o agente responsável pela infecção e seu isolamento e identificação foi realizado, inicialmente por técnicas convencionais e posteriormente por biologia molecular. Desde então, a AC vem se disseminando em rebanhos do Nordeste brasileiro, comprovadamente nos estados de Pernambuco e do Rio Grande do Norte (NASCIMENTO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006).

Atualmente, a doença é considerada uma das principais doenças dos rebanhos caprinos leiteiros, em virtude da redução drástica da produção de leite e das lesões produzidas na glândula mamária, articulações e globo ocular dos animais acometidos, determinando sério prejuízo econômico. Muitos produtores deixaram definitivamente a atividade leiteira em função dessa enfermidade. No entanto, novas estratégias foram desenvolvidas para enfrentar o problema.

Por ser uma doença exótica até o início dos anos 2000 e o diagnóstico laboratorial demandar alguns dias para sua conclusão, a primeira linha de intervenção foi a padronização de um método diagnóstico que permitisse a identificação rápida da resposta imune de animais infectados. Para isso foi desenvolvido um ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indireto que possibilita a realização dos testes em poucas horas, ao contrário da cultura bacteriana que necessita de alguns dias para sua execução (CAMPOS et al., 2009).

Paralelamente, estudos para caracterização bioquímica e molecular das amostras isoladas no Nordeste foram realizados na tentativa de se obter ou pelo menos conhecer de forma mais profunda as amostras mais prevalentes na Região. Os resultados estão em fase final de divulgação.

Logo em seguida foi desenvolvido um produto terapêutico para o controle dos casos clínicos. Trata-se de um bioterápico, produzido a partir de *Mycoplasma agalactiae* e que vem demonstrando ser uma alternativa eficiente e de baixo custo no tratamento da doença (MARINHO, 2008). Este produto tem oferecido, em especial, aos agricultores familiares a possibilidade de reduzir os prejuízos advindos da infecção e o leite pode ser consumido

ininterruptamente, pois não apresenta resíduos químicos. Em algumas situações, especialmente quando o tratamento é iniciado logo após o aparecimento dos primeiros sinais clínicos da enfermidade, a recuperação dos animais se dá de forma rápida, evitando maiores perdas.

A terceira linha de intervenção foi a produção de imunógenos capazes de induzir resposta imune aos animais vacinados. Os primeiros ensaios realizados com antígeno total inativado demonstraram que animais vacinados apresentaram redução significativa dos sinais clínicos da doença após o desafio com *M. agalactiae* (CAMPOS, 2012; ALCÂNTARA et al., 2013). Estes resultados estimularam a realização de novos estudos para melhor entender o mecanismo de ação da resposta imune e conseqüentemente, quais os melhores produtos a serem disponibilizados para os criadores em geral, de maneira que se possa obter o controle dessa importante enfermidade.

Assim, nesse trabalho estão mostrados os perfis antigênicos em ovinos e caprinos imunizados com vacinas produzidas no Laboratório de Vacinas e Diagnóstico da Universidade Federal de Campina Grande e que com as devidas análises, poderão ser destinadas ao setor industrial para produção em escala comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

CAMPOS, A.C. *Produção e avaliação de vacina contra agalaxia contagiosa*. 2012. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

MARINHO, M.L. *Ação terapêutica do bioterápico de Mycoplasma agalactiae em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos*. 2008. 118f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Departamento de medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

NASCIMENTO, E.R.; BARRETO, M.L.; PLATENIK, M.O.; AZEVEDO, E.O.; TABOSA, I.M.; ALCÂNTARA, M.D.B.; ALMEIDA, J.F.; NASCIMENTO, M.G.F. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: *Intern. Cong. Intern. Organiz. Mycoplasmol. (IOM)*. XIV, Vienna, p. 45-46, 2002.

**3 CAPITULO I: AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOGÊNICO DE VACINAS
INATIVADAS CONTRA AGALAXIA CONTAGIOSA EM CAPRINOS**

Manuscrito submetido à Revista Arquivo
Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia/UFMG– Belo Horizonte.

Avaliação do perfil imunogênico de vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa em caprinos

[Evaluation of the immunogenic profile of inactivated vaccines against contagious agalactia in goats]

A.A. Cordeiro¹, A.C. Campos², A.G.M. Moraes¹, A.C. Lima³, M.A. Melo⁴, E.O. Azevedo^{5*}

¹Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB.

²Médica Veterinária, Bolsista de Pós-doutorado Empresarial/CNPq

³Médico Veterinário, Aluno de Especialização em Saúde Coletiva, Faculdades Integradas de Patos (FIP), Patos, PB.

⁴Professora, Doutora, UFCG, Departamento de Medicina Veterinária, Patos, PB

⁵Professor, Doutor, Universidade Federal de Sergipe (UFSE), Departamento de Medicina Veterinária, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000, São Cristóvão, SE. E-mail: edisio@pq.cnpq.br. * Autor para correspondência. Fone: (79) 21056992/99146085

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil imunogênico em caprinos de três vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa (AC), preparadas com linhagens de *Mycoplasma agalactiae* isoladas no Brasil. A vacina 1 foi adsorvida em hidróxido de alumínio, a vacina 2 em Montanide IMS-2215-VG e a vacina 3 em Montanide Gel-01. O perfil proteico do antígeno vacinal foi avaliado por SDS-PAGE e a imunogenicidade da vacina pela técnica de *Western blotting*. A vacina foi administrada em três doses, com intervalo de 21 dias entre a primeira e a segunda e de 180 dias entre a segunda e a terceira. O pool de soros de dez caprinos coletados nos períodos 0, 21, 35, 90, 150, 210, 270 e 360 dias pós-vacinação foram testados pela técnica de *Western blotting*. A vacina 2 foi mais antigênica, seguida da vacina 1. Os anticorpos foram observados 21 dias após a primeira dose para as três vacinas. Houve diferença no perfil das proteínas que foram reconhecidas por anticorpos para as vacinas 1 e 2; a vacina 1 estimulou a produção de anticorpos contra as proteínas P48 e P55 e a vacina 2 contra a P48 e a P80. Conclui-se que as vacinas 1 e 2 tiveram um perfil semelhante quanto a indução da produção de anticorpos.

Palavras-chave: Adjuvante, imunoblotting, *Mycoplasma agalactiae*, pequeno ruminante.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the immunogenicity in goats of three inactivated vaccines against contagious agalactia (CA), prepared with a Brazilian field strain of *Mycoplasma agalactiae*. Three different vaccine formulations were evaluated: Vaccine 1 - antigen adsorbed onto aluminum hydroxide; Vaccine 2 - antigen adsorbed onto Montanide IMS-VG-2215, and Vaccine 3 - antigen adsorbed onto Montanide Gel-01. The protein profile of the vaccine antigen was evaluated by SDS-PAGE and vaccine immunogenicity by Western blotting technique. The vaccines were administered in three doses, with an interval of 21 days between the first and second doses and 180 days between the second and the third doses. Sera pool collected from ten goats in periods 0, 21, 35, 90, 150, 210, 270 and 360 days after first dose were tested by Western blotting technique. Vaccine 2 was more antigenic than vaccine 1. The antibodies were observed 21 days after the first dose for all vaccines. It has difference in the proteins profile that were recognized by antibodies to vaccines 1 and 2: vaccine 1 stimulated antibodies production against P48 and P55 proteins and the vaccine 2 against P80 and P48 proteins. We concluded that vaccines 1 and 2 had a similar profile in induction of antibody production.

Key words: Adjuvant, immunoblotting, *Mycoplasma agalactiae*, small ruminant.

INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma agalactiae* é um dos principais agentes causadores da agalaxia contagiosa (AC) de caprinos e ovinos, que é uma síndrome caracterizada por agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite. A infecção se dissemina rapidamente no rebanho, determinando grandes perdas econômicas, decorrentes da diminuição da produção do leite e da morte dos animais. A enfermidade é endêmica em países do Mediterrâneo, África e região oeste e central da Ásia e é uma doença emergente em países da América e no Japão (Azevedo *et al.*, 2006; OIE, 2012).

Uma das estratégias de controle da AC é a adoção da antibioticoterapia por longos períodos que reduz os sinais clínicos, mas mantém um grande número de animais portadores. Além desta, a indução de partos com separação imediata das crias e o uso de bioterápico foram estudadas (Alcântara *et al.*, 2003; Marinho, 2008).

As primeiras vacinas produzidas contra AC em caprinos e ovinos datam da década de 70 (Foggio *et al.*, 1970), mas apenas na década de 90 é que passou a ser utilizada mais intensamente na Europa, onde a doença causa perdas econômicas consideráveis (León Vizcaíno *et al.*, 1995).

No Brasil, foram testadas vacinas inativadas de *M. agalactiae* adsorvidas com diferentes adjuvantes (hidróxido de alumínio, Montanide IMS-2215-VG e Montanide Gel-01), obtendo-se bons resultados na que continha adjuvante oleoso (Campos, 2012).

O *M. agalactiae* pode alterar os antígenos de superfície de acordo com De La Fé *et al.* (2006). Em amostras brasileiras de *M. agalactiae*, isoladas de leite caprino de infecção natural, foram identificadas proteínas com peso molecular que variaram de 30 a 135 kD no SDS-PAGE, com imunogenicidade para as que possuíam pesos moleculares de 135, 55 e 48 kD (Campos, 2012).

A imunização como estratégia de prevenção da agalaxia contagiosa, pode se tornar uma realidade no Brasil, pois os primeiros estudos demonstraram o potencial das vacinas produzidas com amostras isoladas no Nordeste do país. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de anticorpos anti-proteínas *M. agalactiae* em caprinos vacinados com antígeno bruto inativado, adsorvido com diferentes adjuvantes.

MATERIAL E MÉTODOS

As vacinas foram preparadas a partir da amostra de *M. agalactiae* (BrPB3.03) previamente caracterizada (Campos, 2012), cultivada durante 96 horas em caldo Hayflick modificado, pH 7.8, enriquecido com 20% de soro equino inativado a 37°C em microaerofilia. O cultivo foi centrifugado duas vezes a 3800g durante uma hora e ressuspenso em tampão salino fosfato [PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.2 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.6].

A suspensão bacteriana na concentração protéica pré-inativação de 5 mg/dose da vacina foi inativada com formaldeído a 0.4% (v/v) por 24 horas a 37°C. A suspensão inativada foi adsorvida sob agitação durante 3 horas a temperatura ambiente, com o respectivo adjuvante: a) Vacina 1: Gel de hidróxido de alumínio na concentração de 6mg/mL de vacina (adjuvante aquoso); b) Vacina 2: Montanide IMS 2215 VG PR (Seppic Inc.), na concentração de 25% (v/v) (adjuvante oleoso); c) Vacina 3: Montanide Gel 01 PR

(Seppic Inc.), a 5% (v/v) (adjuvante aquoso), descrito por Campos (2012). As vacinas foram estocadas a 4°C.

Quarenta caprinos sem padrão racial definido, machos e fêmeas, com idade variando de 6 a 48 meses, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos vacinais e um controle, com dez animais cada. A imunização foi realizada por via subcutânea na região axilar direita e esquerda, previamente tricotomizada, com duas doses de 2 mL com intervalo de 21 dias e uma terceira dose 180 dias após a segunda vacinação. O grupo controle recebeu o mesmo protocolo de vacinação utilizando PBS estéril como inóculo (Campos, 2012).

Os soros dos caprinos foram coletados nos dias 0, 21, 35, 90, 150, 210, 270 e 360 após a 1ª vacinação.

Para análise do perfil protéico pelo *Western blotting* (WB), a amostra de *M. agalactiae* (BrPB3.03) em caldo Hayflick modificado (1,5 mL) foi centrifugada a 12000g por 20 minutos e o *pellet* foi ressuspenso em PBS, pH 7,6. A concentração de proteína foi determinada por espectrofotometria (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Alemanha) utilizando um filtro de 280 nm. A amostra foi misturada em tampão de lise [500 mM Tris/HCl pH 6,8, 4,6% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) 2-mercaptoetanol e 0.004% azul de bromofenol] e fervida por 5 min. Posteriormente, 15 µg de proteínas de *M. agalactiae* foram separadas por SDS-PAGE 12% (Laemmli, 1970). A eletroforese foi realizada a 250 V e 50 mA por gel durante 40 minutos, com posterior coloração do gel com a solução de Coomassie blue [0.005% (p/v) azul brilhante de Coomassie R-250, 7% (v/v) ácido acético, 25% (v/v) metanol].

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0.45 µm a 8 V e 700 mA por 70 min. As membranas foram bloqueadas em solução de bloqueio [PBS pH 7.6; 2% (p/v) leite em pó desnatado (LPD)] por 30 minutos a 37°C, e em seguida lavadas três vezes em PBS a temperatura ambiente por 5 minutos.

A membrana sensibilizada foi cortada em tiras e imersa no pool dos soros dos caprinos vacinados diluído 1:100 e nos controles positivo e negativo diluídos 1:200 em solução de bloqueio e incubadas a 37°C por 45 minutos. O controle negativo do WB constituiu de um pool de soros de cinco caprinos não imunizados e negativos para *M. agalactiae* e o controle positivo de um pool de soros de cinco animais com sinais clínicos de AC, testados previamente pelo ELISA indireto (Campos *et al.*, 2009).

Após incubação, as tiras foram lavadas e em seguida incubadas com conjugado proteína G peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:9000 a 37°C por 45 minutos. As tiras foram novamente lavadas e incubadas em solução de revelação [0,1M tampão citrato pH 5.0; 0.3 mg/mL 3'-3'-5'-5'-tetrametilbenzidina (TMB) e 0.38% peróxido de hidrogênio]. Após cinco minutos, a reação foi interrompida com água destilada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da linhagem de *Mycoplasma agalactiae* utilizada na vacina pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostra bandas proteicas de 20 a 120 kDa. Três bandas localizadas entre 20 e 30 kDa, 50 e 70 kDa e acima de 120 kDa não tiveram o peso molecular definido a partir do peso molecular padrão utilizado neste estudo (Fig. 1). De La Fé *et al.* (2006) observam várias proteínas entre os intervalos anteriormente citados e em torno de 5 bandas com pesos moleculares acima de 102 kDa e relatam a imunogenicidade de proteínas com pesos moleculares de 24-25, 60 e 104-105kDa.

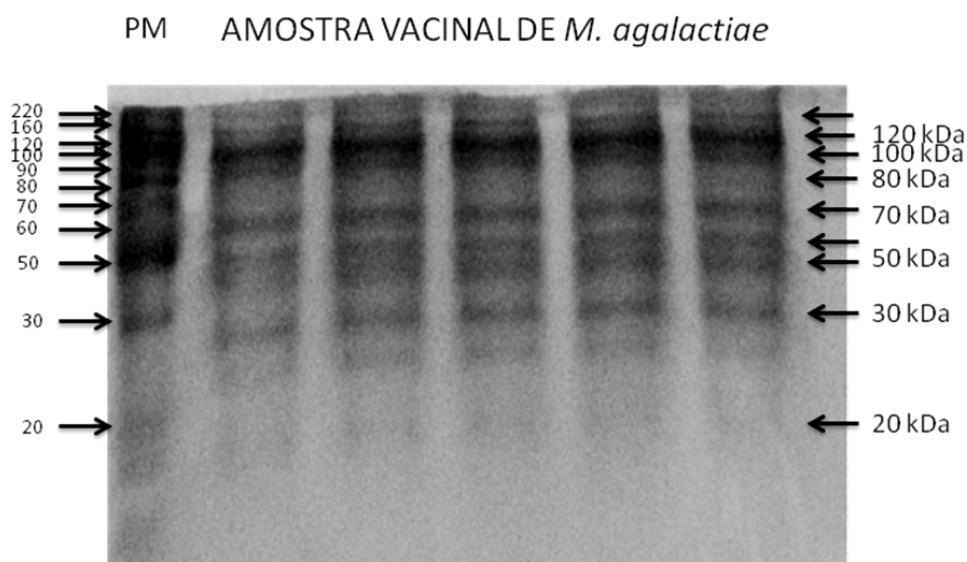


Figura 1. SDS-PAGE de proteína total de *M. agalactiae* corado com Comassie blue. Numeração à esquerda: peso molecular; Numeração à direita: pesos moleculares das proteínas de *M. agalactiae*.

Através do imunoblotting foi possível verificar a presença de anticorpos IgG anti- *M. agalactiae* no pool dos soros dos caprinos vacinados com as três vacinas, entretanto, as vacinas 2 (adjuvante oleoso) foi mais antigênica, seguida da vacina 1 (adjuvante hidróxido de alumínio), confirmando os achados de Campos (2012) através do ELISA indireto. Adicionalmente, também houve diferença no perfil das proteínas que foram reconhecidas

por anticorpos para as vacinas 1 e 2; a vacina 1 estimulou a produção de anticorpos contra as proteínas P48 e P55 e a vacina 2 contra a P48 e a P80.

Buonavoglia *et al.* (1998) e Greco *et al.* (2002) observaram que a vacina associada ao adjuvante oleoso foi mais imunogênica do que a vacina com adjuvante hidróxido de alumínio. Buonavoglia *et al.* (2008) verificaram que a vacina constituída por uma emulsão de três óleos minerais impediu a infecção dos animais, caracterizada por sinais clínicos e eliminação da bactéria pelo leite e por via nasal, após o desafio.

Em relação à presença de anticorpos anti- *M. agalactiae*, observou-se que já havia produção de anticorpos 21 dias após a primeira dose para as três vacinas. Nos períodos 90, 150 e 210 houve uma queda na quantidade de anticorpos (Fig. 2), representado pela diminuição da intensidade das bandas no *Western blotting* (Fig. 2). A diminuição na produção de anticorpos em um curto período pós-vacinação, provavelmente, deve-se ao fato de que a vacina inativada estimular níveis de anticorpos mais baixos e menos persistentes, necessitando de repetições das doses em períodos mais curtos (León Vizcaíno *et al.*, 1995; Buonavoglia *et al.*, 1998), fato comprovado com o aumento da intensidade das bandas nos dias 270 e 360 após o reforço vacinal realizado 180 dias após a 2ª dose (Fig. 2).

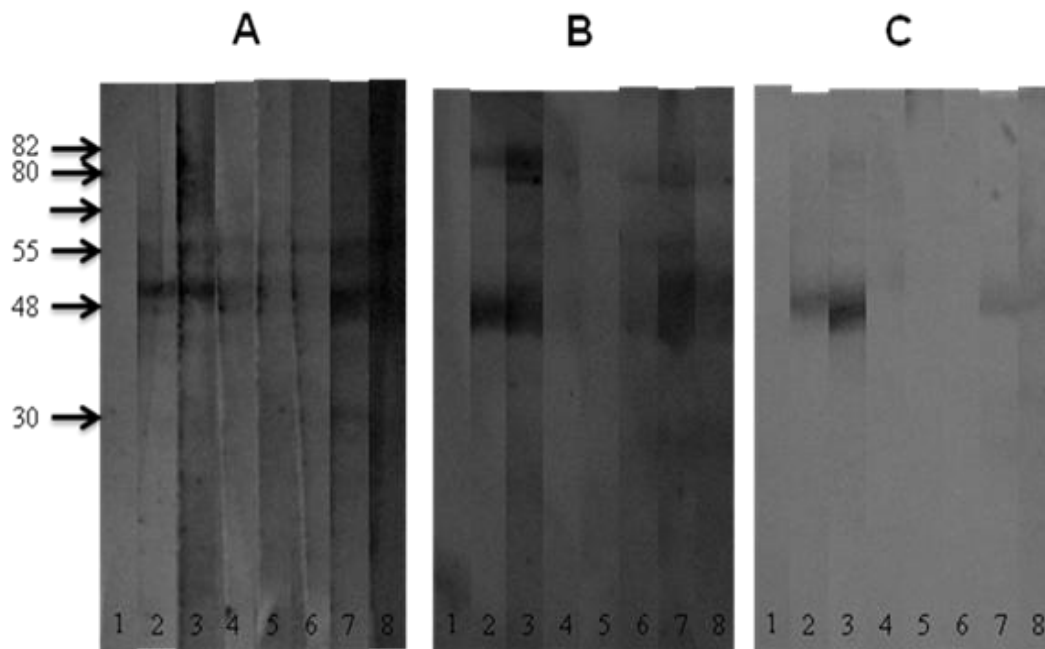


Figura 2. Immunoblotting de proteína total de *M. agalactiae* utilizando soros de caprinos vacinados com as vacinas experimentais 1 (A), 2 (B) e 3 (C). A numeração na fita corresponde aos dias após a 1ª dose da vacinação: 1: 1ª dose da vacina; 2: 21 dias pós-vacinação; 3: 35 dias pós-vacinação; 4: 90 dias pós-vacinação; 5: 150 dias pós-vacinação; 6: 210 dias pós-vacinação; 7: 270 dias pós-vacinação e 8: 360 dias pós-vacinação. Os pesos moleculares das proteínas em kDa estão indicados à esquerda.

Pelo *Western blotting*, observa-se que, após as duas primeiras doses, a vacina constituída de extrato total de *M. agalactiae* foi capaz de estimular a produção de anticorpos contra as proteínas com 82, 80, 55, 48 kDa. Uma banda tênue com peso molecular de 30 kDa é vista nas vacinas 1 e 2 após a terceira dose. Após a terceira dose, ministrada 180 dias após a segunda, as proteínas mais antigênicas foram as de 80, 55 e 48 kDa. Anticorpos anti- proteínas com 55 e 48 kDa persistiram mesmo no período que houve queda do título. Após a terceira dose vacinal reapareceram as bandas de 55 e 48 kDa para as vacinas 1 e 2, 80 kDa para a vacina 2 e 48 kDa para a vacina 3 (Fig. 2).

Campos (2012) relatou que a proteína P48 foi a mais imunogênica em soros de caprinos naturalmente infectados. A P48 é uma lipoproteína que possui uma potente ação imunoestimulante, sendo um dos principais antígenos encontrados na infecção por *M. agalactiae* (Rosati *et al.*, 1999, 2000). Chessa *et al.* (2009) imunizaram camundongos com uma vacina de DNA contendo o gene da P48 e houve estímulo da resposta imune celular (Th1) e humoral (Th2); IgG1 anti-P48 recombinante foi identificado por ELISA.

Anticorpos anti-P55 foram observados, nas vacinas 1 e 2, 21 dias após a primeira vacinação e estavam consideravelmente diminuídos após 90 dias, reaparecendo após a dose de reforço. Santona *et al.*(2002) e Tola *et al.* (1997) relatam que a P55 é intensamente imunogênica em animais infectados com *M. agalactiae*.

Anticorpos IgG anti- a fração de 80 kDa foram observados 35 dias após a 1ª dose, além de uma outra banda de aproximadamente 82 kDa na vacina 2. No artigo de Tola *et al.* (1997) observa-se uma banda imunogênica acima de 80 kDa revelada com soros de ovinos com 30 dias após o início dos sinais clínicos, mas os autores não tecem comentários.

A vacinação com o extrato bruto também foi capaz de estimular a resposta humoral contra a P80, uma lipoproteína de membrana (Tola *et al.*, 2001), que foi reconhecida por soros de ovinos em início da sintomatologia clínica (Tola *et al.*, 1997), sugerindo-a como um marcador para diagnóstico precoce.

Para as vacinas 1 e 2, percebe-se uma discreta banda imunogênica de aproximadamente 30 kD no immunoblotting realizado aos 270 e 360 dias, que corresponde a 70 dias após a terceira aplicação. De la Fé *et al.* (2006) e Tola *et al.* (1997) observaram que esta proteína também é imunogênica na infecção natural em ovinos. Fleury *et al.* (2001) observaram que a P30 estimulou uma resposta humoral em ovelhas infectadas artificialmente com diferentes linhagens de *M. agalactiae*; os anticorpos persistiram

durante, pelo menos, 2 meses após a infecção. Nas vacinas estudadas, a P30 foi pouco antigênica, que pode ser em função de modificações na estrutura da proteína pelo formol ou durante a confecção da vacina.

O gene para a P30 é específico para *M. agalactiae* (Fleury *et al.*, 2001) e a produção de anticorpos anti-P30 pode indicar que a linhagem de *M. agalactiae* utilizada na vacina faça parte do sorotipo A-D, de acordo com Bergonier *et al.* (1996) e Fleury *et al.* (2001).

CONCLUSÕES

As vacinas 1 e 2 tiveram um perfil semelhantes quanto a indução da produção de anticorpos contra proteínas de superfície de *Mycoplasma agalactiae*.

AGRADECIMENTO

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, M.D.B.; AZEVEDO, E.O.; FARIAS, A.A. *et al.* Indução de parto e separação das crias para controle da agalaxia contagiosa em caprinos. In: CONG. LATINAMER. BUIATRIA, 11., 2003, Salvador. *Anais...* Salvador: [s.n.] 2003. p.71. (Resumo).
- AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R. *et al.* Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Braz. J. Microbiol.*, v.37, p.576-581, 2006.
- BERGONIER, D.; DE SIMONE F.; RUSSO P. *et al.* Variable expression and geographic distribution of *Mycoplasma agalactiae* surface epitopes demonstrated with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett.*, v.143, n.2-3, p.159-65, 1996.
- BUONAVOGLIA, D.; FASANELLA, A.; SAGAZIO, P. *et al.* Persistence of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* in vaccinated sheep. *New Microbiol.*, v.21, n.2, p.209-212, 1998.
- BUONAVOGLIA, D.; GRECO, G.; QUARANTA, V. *et al.* An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *New Microbiol.*, v.31, p.117-123, 2008.

- CAMPOS, A.C.; TELES, J.A.A.; AZEVEDO, E.O. *et al.* ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. *Small Rumin. Res.*, v.84, p.70-75, 2009.
- CAMPOS, A.C. *Produção e avaliação de vacina contra agalaxia contagiosa*. 2012. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Departamento de medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. Disponível em: <<http://www.pgv.ufrpe.br/>>.
- CHESSA, B.; PITTAU, M.; PURICELLI, M. *et al.* Genetic immunization with the immunodominant antigen P48 of *Mycoplasma agalactiae* stimulates a mixed adaptive immune response in BALBc mice. *Res Vet Sci.*, v.86, p.414-420, 2009.
- DE LA FE, C.; ASSUNÇÃO, P.; ROLALES, R.S. *et al.* Characterization of protein and antigen variability among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) and *Mycoplasma agalactiae* field strains by SDS-PAGE and immunoblotting. *Vet. J.*, v.171, p.532-538, 2006.
- FLEURY, B.; BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. *et al.* Characterization and Analysis of a Stable Serotype-Associated Membrane Protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, n.8, p.2814–2822, 2001.
- FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J.R.; ERDAB, O. ARISOY, F. Contagious agalactia of sheep and goats preliminary studies on vaccines. *J. Comp. Path.*, v.80, p.345-359, 1970.
- GRECO, G.; CORRETE, M., BUONAVOGLIA, D. *et al.* Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *New Microbiol.*, v.25, n.1, p.17-20, 2002.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.
- LEON VIZCAINO, L.; GARRIDO ABELLAN, F.; CUBERO PABLO, M.J.; PERALES, A. Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. *Vet. Rec.*, v.137, n.11, p.266-269, 1995.
- MARINHO, M.L. *Ação terapêutica do bioterápico de Mycoplasma agalactiae em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos*. 2008. 118f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Departamento de medicina Veterinária, Universidade Federal

Rural de Pernambuco, Recife, PE. Disponível em: <http://www.ihb.org.br/dpub/docs/editoradoihd/teses/melania_loureiro_marinho/melania_loureiro_marinho.pdf>. Acessado em: 15 mai. 2013.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2012. Disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines. Acessado em: 13 abr. 2013.

ROSATI, S.; POZZI, S.; ROBINO, P. *et al.* P48 major surface antigen of *Mycoplasma agalactiae* is homologous to a *malp* product of *Mycoplasma fermentans* and belongs to a selected family of bacterial lipoproteins. *Infect. Immun.*, v.67, n.11. p.6213-6216, 1999.

ROSATI, S.; ROBINO, P.; FADDA, M. *et al.* Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. *Vet. Microbiol.*, v.71, p.201-210, 2000.

SANTONA, A.; CARTA, F.; FRAGHI, P.; TURRINI, F. Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the use of synthetic peptides. *Infect. Immun.*, v.70, n.1, p.171-176, 2002.

TOLA, S.; MANUTA, D.; COCCO, M. *et al.* Characterization of surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.154, p.355-362, 1997.

TOLA S.; CROBEDDU S.; CHESSA G. *et al.* Sequence, cloning, expression and characterisation of the 81-kDa surface membrane protein (P80) of *Mycoplasma agalactiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.202, p.45-50, 2001.

**4 CAPITULO II: AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOGÊNICO DE VACINAS
INATIVADAS CONTRA AGALAXIA CONTAGIOSA EM OVINOS**

Manuscrito submetido à Revista Ciência
Rural/UFSM - Santa Maria.

Avaliação do perfil imunogênico de vacinas inativadas contra agalaxia contagiosa em ovinos

Evaluation of the immunogenic profile of inactivated vaccines against contagious agalactia in sheep

Aline Antas Cordeiro¹ Ana Claudia Campos² Aline Guedes Mamede de Moraes¹ Aldenir Cavalcanti de Lima³ Marcia Almeida de Melo⁴ Edisio Oliveira de Azevedo^{5*}

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil imunogênico em ovinos de três vacinas produzidas com linhagens brasileiras de *Mycoplasma agalactiae*. O perfil proteico do antígeno vacinal foi avaliado por SDS-PAGE e a imunogenicidade da vacina pela técnica de *Western blot*. A vacina foi inativada com formol, adsorvida em hidróxido de alumínio (Vacina 1), Montanide IMS-2215 (Vacina 2), Montanide Gel-01 (Vacina 3) e administradas em três doses. Entre a primeira e a segunda dose houve um intervalo de 21 dias, e entre a segunda e a terceira de 180 dias. O pool de soros de dez ovinos coletados nos períodos 0, 21, 35, 90, 150, 210, 270 e 360 dias pós-vacinação foram testados pela técnica de *Western blot*. A vacina 2 foi mais antigênica, com detecção de anticorpos 21 dias após a primeira dose. Para as vacinas 1 e 3, os anticorpos são verificados após 35 dias, com queda acentuada aos 90 dias; apenas anticorpos contra a P48 apareceram após a

¹Aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB.

²Médica Veterinária, Bolsista de Pós-doutorado Empresarial/CNPq.

³Médico Veterinário, Aluno de Especialização em Saúde Coletiva, Faculdades Integradas de Patos (FIP), Patos, PB

⁴ Professora, Doutora, Departamento de Medicina Veterinária, UFCG, Patos, PB.

^{5*}Professor, Doutor, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Sergipe (UFSE), Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos, Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze, CEP 49100-000, São Cristóvão, SE. E-mail: edisio@pq.cnpq.br. Fone: (79) 21056992/99146085. Autor para correspondência.

terceira dose de forma discreta. Contra a vacina 2, ainda persistiram anticorpos contra a P48, P55 e P80 nos períodos 90, 150 e 210, que aumentaram após a terceira dose. Concluiu-se que a vacina 2 induziu a resposta humoral de forma estável contra proteínas de *Mycoplasma agalactiae*.

Palavras-chave: antigenicidade, Brasil, imunidade humoral, imunoblotting.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the immunogenic profile in sheep of three vaccines produced with a field Brazilian strains of *Mycoplasma agalactiae*. The vaccine protein profile was evaluated by SDS-PAGE and vaccine immunogenicity by Western blot. The vaccine was inactivated with formaldehyde and adsorbed onto three different adjuvants: with aluminum hydroxide (Vaccine 1), Montanide IMS 2215 (Vaccine 2), and Gel Montanide-01 (Vaccine 3). The vaccine was administered in three doses. Between the first and second dose there was an interval of 21 days, and between the second and the third one of 180 days. A pool of ten sera collected in 0, 21, 35, 90, 150, 210, 270 and 360 days after first vaccination were tested by Western blot techniques. The second vaccine was more antigenic with antibody detection 21 days after first dose. For both vaccines 1 and 3, antibodies were present 35 days after first dose, with a significant drop at 90 days; only antibodies against P48 discreetly appeared after the third dose. Stimulation induced by vaccine 2 produced antibodies against P48, P55 and P80 proteins that persisted until 90, 150 and 210 days after first dose, which rose again after third dose. It was concluded that the vaccine 2 induced stable humoral immunity against *Mycoplasma agalactiae* proteins.

Key words: antigenicity, Brazil, immunoblotting, humoral immunity.

INTRODUÇÃO

O *Mycoplasma agalactiae* é o agente da agalaxia contagiosa (AC), caracterizada por agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite em caprinos e ovinos. A infecção causa perdas econômicas, principalmente em rebanhos leiteiros de caprinos e ovinos, devido aos surtos ou às infecções crônicas, com alta incidência de mastite subclínica (GÓMEZ-MARTÍN et al., 2013). A enfermidade tem distribuição mundial, sendo endêmica na Ásia, África e América (OIE, 2012).

Os primeiros casos da AC causada por *M. agalactiae* no Brasil ocorreram na Paraíba, disseminando-se para os Estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte (NASCIMENTO et al., 2002; AZEVEDO et al., 2006). Desde então, tem sido uma das principais preocupações dos caprinocultores por causa dos sérios prejuízos econômicos.

O *M. agalactiae* possui uma família gênica que gera diversidade nos antígenos de superfície, contribuindo para os mecanismos de patogênese e evasão do sistema imune do hospedeiro (BERGONIER et al., 1996; FLITMAN-TENE et al., 2000; GLEW et al., 2000). Esta diversidade é observada em amostras isoladas em hospedeiros diferentes, caprinos e ovinos, e também em relação à região geográfica (SOLSONA et al., 1996). Os diferentes isolados apresentam bandas protéicas com 18 a 135 kD (SOLSONA et al., 1996; TOLA et al., 1997). Amostras brasileiras de *M. agalactiae*, isoladas de caprino, apresentaram bandas protéicas de 30 a 135 kD, com imunogenicidade para as de 135, 55 e 48 kD (CAMPOS, 2012).

As proteínas P55, P48, P40 e P30 são descritas como imunodominantes (SANTONA et al., 2002; ROSATI et al., 2000; TOLA et al., 1997; FLEURY et al., 2002; FLEURY et al., 2001) e vacinas tem sido testadas com o objetivo de evitar a infecção e eliminação do micoplasma (GRECO et al., 2002; DE LA FÉ et al., 2007a; 2007b). Recentemente, no

Brasil, foram avaliadas, em caprinos e ovinos, vacinas inativadas constituída de *M. agalactiae* isolado de caprinos. Os melhores resultados foram obtidos com a vacina adsorvida com adjuvante oleoso (CAMPOS, 2012).

A partir dos primeiros estudos que evidenciaram o potencial das vacinas constituídas de *M. agalactiae* isoladas no Nordeste do país, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil antigênico, em ovinos, das vacinas quando adsorvidas com adjuvante oleoso e aquoso.

MATERIAL E MÉTODOS

As vacinas foram preparadas a partir da amostra de *M. agalactiae* (BrPB3.03) previamente caracterizada por CAMPOS (2012), cultivada durante 96 horas em caldo Hayflick modificado, pH 7.8, enriquecido com 20% de soro equino inativado a 37°C em microaerofilia. O cultivo foi centrifugado a 3800g durante uma hora e ressuspenso em tampão salino fosfato [PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.2 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.6]. A suspensão bacteriana na concentração proteica pré-inativação de 5 mg/dose da vacina foi inativada com formaldeído a 0,4% (v/v) por 24 horas a 37°C.

A suspensão inativada foi adsorvida sob agitação durante três horas a temperatura ambiente, com o respectivo adjuvante: a) Vacina 1: Gel de hidróxido de alumínio na concentração de 6mg/mL de vacina (adjuvante aquoso); b) Vacina 2: Montanide IMS 2215 VG PR (Seppic Inc.), na concentração de 25% (v/v) (adjuvante oleoso); c) Vacina 3: Montanide Gel 01 PR (Seppic Inc.), a 5% (v/v) (adjuvante aquoso) (CAMPOS, 2012). As vacinas foram estocadas a 4°C

Quarenta ovinos sem padrão racial definido, machos e fêmeas, com idade variando de 6 a 48 meses, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos vacinais e um controle, com dez animais cada.

A vacinação foi realizada em três doses de 2mL administradas por via subcutânea na região axilar direita e esquerda, previamente tricotomizadas, com intervalo de 21 dias entre a primeira e segunda e 180 dias entre a segunda e a terceira. O grupo controle recebeu o mesmo protocolo de vacinação utilizando PBS estéril como inóculo (CAMPOS, 2012).

Os soros dos ovinos foram coletados nos dias 0, 21, 35, 90, 150, 210, 270 e 360 após a 1ª vacinação.

No *Western blot* (WB), a amostra de *M. agalactiae* (BrPB3.03), cultivada em meio Hayflick modificado, foi centrifugada a 12000g por 20 minutos e o *pellet* ressuspenso em PBS, pH 7.6. A concentração protéica foi determinada por espectrofotometria (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Alemanha) utilizando um filtro de 280 nm. A amostra foi misturada em tampão de lise [500 mM Tris/HCl pH 6.8, 4.6% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) 2-mercaptoetanol e 0.004% azul de bromofenol] e fervida por 5 min. Posteriormente, 15 µg de proteínas de *M. agalactiae* foram separadas por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi realizada a 250 V e 50 mA por gel durante 40 minutos, com posterior coloração do gel com solução de Coomassie blue [0.005% (p/v) azul brilhante de Coomassie R-250, 7% (v/v) ácido acético, 25% (v/v) metanol].

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0.45 µm a 8 V e 700 mA por 70 min. As membranas foram bloqueadas em solução de bloqueio [PBS pH 7.6; 2% (p/v) leite em pó desnatado (LPD)] por 30 minutos a 37°C, e em seguida lavadas três vezes em PBS por 5 minutos a temperatura ambiente.

A membrana sensibilizada foi cortada em tiras e imersa no pool dos soros dos ovinos vacinados diluído 1:50 e nos controles positivo e negativo diluídos 1:200 e incubadas a 37°C por 45 minutos. O controle negativo do WB constituiu de um pool de soros de cinco caprinos não imunizados e negativos para *M. agalactiae* e o controle positivo de um pool

de soros de cinco animais com sinais clínicos de agalaxia contagiosa, testados previamente pelo ELISA indireto (CAMPOS et al., 2009).

Após incubação, as tiras foram lavadas e em seguida incubadas com conjugado proteína G peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:9000 a 37°C durante 45 minutos. As tiras foram novamente lavadas e incubadas em solução de revelação [0,1M tampão citrato pH 5.0, 0.3 mg/mL 3'-3'-5'-5'-tetrametilbenzidina (TMB) e 0.38% peróxido de hidrogênio]. Após cinco minutos, a reação foi interrompida com água destilada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As vacinas foram capazes de induzir a produção de anticorpos IgG anti- *M. agalactiae*, entretanto as vacinas 1 e 3 foram menos antigênicas, só estimulando a resposta humoral após a segunda dose (tira 3, Figura 1).

Os adjuvantes interferem na resposta imune em relação ao antígeno, além da possibilidade de apresentar reação inflamatória na área de aplicação da vacina. De acordo com os dados do imunoblotting, a vacina 2 estimulou uma maior produção de anticorpos em relação as outras vacinas em todos os períodos, confirmando o estudo realizado por CAMPOS (2012). A maior eficiência da vacina 2 deve-se ao tipo de adjuvante utilizado, resultados também obtidos por BUONAVOGLIA et al. (2008; 2010), quando utilizaram adjuvantes oleosos na produção da vacina.

Outro aspecto relevante em relação ao comportamento das vacinas é que para a vacina 2 houve diferença quanto à imunogenicidade das proteínas. Nos períodos de 90, 150 e 210 dias após a primeira dose (fitas 4, 5 e 6, Figura 1) é que se percebe a ausência de anticorpos contra a maioria das proteínas do micoplasma, mas com reaparecimento das bandas após o reforço, realizado seis meses após a segunda dose da vacina (fitas 7 e 8,

Figura 1). Esta diminuição na produção de anticorpos é justificada por se tratar de uma vacina inativada, que estimula níveis de anticorpos mais baixos e menos persistentes, devendo ser repetida em períodos mais curtos (LEON VIZCAINO et al., 1995; BUONAVOGLIA et al., 1998). Para as vacinas 1 e 3 não houve aumento na eficiência da vacina, mesmo após o reforço, que pode também estar associada à origem do antígeno, uma vez que a amostra foi isolada de caprinos, fato observado por CAMPOS (2012).

Através do imunoblotting, observa-se que as proteínas com peso molecular de 82, 80, 55, 48 e 30 kDa foram as mais imunogênicas, com imunodominância da P248. Contra a P48 houve produção de anticorpos mesmo nas vacinas 1 e 3. Duas bandas acima de 55 kDa aparecem após segunda vacinação, mas não se mantêm após a terceira dose.

CAMPOS (2012) relatou que a P48 foi a mais imunogênica para caprinos naturalmente infectados. A P48 é uma lipoproteína que estimula respostas imunes celular e humoral e com potencial para aplicação em diagnóstico (ROSATI et al, 2000; CHESSA et al., 2009).

Para a P55, a resposta humoral é observada a partir do dia 35, desaparecendo com 90 dias (fita 4, Figura 1), e com aumento após o reforço nos dias 270 e 360 na vacina 2. Estes resultados são diferentes dos obtidos por TOLA et al. (1997), provavelmente porque os autores utilizaram soros de animais com até 30 dias do início dos sinais clínicos.

A produção de anticorpos contra as proteínas de 82 e 80 kDa ocorreu na vacina 2 após 21 dias da 1ª vacinação e na vacina 1 apenas após a 2ª dose. Noventa dias após a 1ª dose já não se observam anticorpos contra a P82, mas há uma banda discreta para a P80.

Com o reforço 180 dias após a segunda vacinação, surgem mais anticorpos anti- P80 (fitas 7 e 8, Figura 1). A P80 é uma das proteínas encontradas em *M. agalactiae* isoladas de caprinos na Espanha e de ovinos na Itália, infectados naturalmente (DE LA FÉ et al., 2006;

TOLA et al., 1997; 1996) e foi reconhecida por soros ovinos na fase inicial da sintomatologia clínica (TOLA et al., 1997).

Anticorpos contra a proteína de aproximadamente 82 kD não foi descrita como imunogênica por outros autores. No artigo de TOLA et al. (1997), observa-se uma banda imunogênica em soros de ovinos com 30 dias após o início da sintomatologia clínica, logo acima da proteína de 80 kDa, mas os autores não tecem comentários.

Uma proteína de aproximadamente 30 kD é visualizada na vacina 2 após 21 dias da primeira dose. Esta proteína foi detectada em diferentes amostras de *M. agalactiae* em estudos conduzidos por DE LA FÉ et al. (2006) e TOLA et al. (1997). FLEURY et al. (2001) avaliaram a resposta humoral à P30 de ovelhas infectadas artificialmente com diferentes linhagens de *M. agalactiae*, indicaram que a P30 é altamente imunogênica e induz uma resposta de anticorpos precoce que persiste durante 2 meses após a infecção. O fato de não termos observado uma produção marcante de anticorpos anti-P30 pode ser em função de alterações estruturais na proteína causadas durante a confecção da vacina.

CONCLUSÃO

A vacina 2 induziu a resposta humoral de forma estável contra proteínas de *Mycoplasma agalactiae*.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, E.O. et al. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.576-581, 2006.

BERGONIER, D. et al. Variable expression and geographic distribution of *Mycoplasma agalactiae* surface epitopes demonstrated with monoclonal antibodies. **FEMS Microbiology Letters**, v.143, n.2-3, p.159-65, 1996.

BUONAVOGLIA, D. et al. Persistence of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* in vaccinated sheep. **New Microbiologica**, v.21, n.2, p.209-212, 1998.

BUONAVOGLIA, D. et al. An oil-emulsion vaccine induces full-protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. **New Microbiologica**, v.31, p.117-123, 2008.

BUONAVOGLIA, D. et al. Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. **Research in Veterinary Science**, v.88, p.16-19, 2010.

CAMPOS, A.C. et al. ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v.84, p.70-75, 2009.

CAMPOS, A.C. **Produção e avaliação de vacina contra agalaxia contagiosa**. 2012. 75f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

CHESSA, B. et al. Genetic immunization with the immunodominant antigen P48 of *Mycoplasma agalactiae* stimulates a mixed adaptive immune response in BALBc mice. **Research in Veterinary Science**, v.86, p.414-420, 2009.

DE LA FE, C. et al. Characterization of protein and antigen variability among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) and *Mycoplasma agalactiae* field strains by SDS-PAGE and immunoblotting. **The Veterinary Journal**, v.171, p.532-538, 2006.

DE LA FE, C. et al. Field trial of a combined vaccine against caprine contagious agalactia: humoral immune response in lactating goats. **The Veterinary Journal**, v.174, p.610–615, 2007a.

- DE LA FE, C. et al. Field trial of two dual vaccines against *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in goats. **Vaccine**, v.25, p.2340–2345, 2007b.
- FLEURY, B. et al. Characterization and Analysis of a Stable Serotype-Associated Membrane Protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.8, p.2814–2822, 2001.
- FLEURY, B. et al. Characterization of P40, a Cytadhesin of *Mycoplasma agalactiae*. **Infection and Immunity**, v.70, n.10, p.5612-5621, 2002.
- FLITMAN-TENE, R. et al. A chromosomal region of *Mycoplasma agalactiae* containing vsp-related genes undergoes in vivo rearrangement in naturally infected animals. **FEMS Microbiology Letters**, v.191, p.205–212, 2000.
- GLEW, M.D. et al. Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. **Infection and Immunity**, v.68, p.4539–4548. 2000.
- GÓMEZ-MARTÍN, A. et al. Contagious agalactia due to *Mycoplasma* spp. in small dairy ruminants: Epidemiology and prospects for diagnosis and control. **The Veterinary Journal**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.04.015>>. Acesso em: 12 jul. 2013. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.04.015.
- GRECO, G. et al. Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. **New Microbiologica**, v.25, n.1, p.17-20, 2002.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEÓN VIZCAÍNO, L. et al. Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. **Veterinary Record**, v.137, n.11, p.266-269, 1995.

NASCIMENTO, E.R. et al. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: CONGRESS OF THE INTERNATIONAL ORGANISATION FOR MYCOPLASMOLOGY (IOM), 14., 2002. Vienna, Austria. **Proceedings...**Vienna: [s.n.] 2002. p.45-46.

OIE. **Organização Mundial de Saúde Animal**, 2012. Acessado em 13 abr. 2013. Online. Disponível em:

http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines

ROSATI, S. et al. Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. **Veterinary Microbiology**, v.71, p.201-210, 2000.

SANTONA, A. et al. Mapping antigenic sites of an immunodominant surface lipoprotein of *Mycoplasma agalactiae*, AvgC, with the us of synthetic peptides. **Infection and Immunity**, v.70, n.1, p.171-176, 2002.

SOLSONA, A. et al. Genomic, protein homogeneity and antigenic variability of *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary Microbiology**, v.50, p.45-58, 1996.

TOLA, S. et al. Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. **FEMS Microbiology Letters**, v.143, p.259-265, 1996.

TOLA, S. et al. Characterization of surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. **FEMS Microbiology Letters**, v.154, p.355-362, 1997.

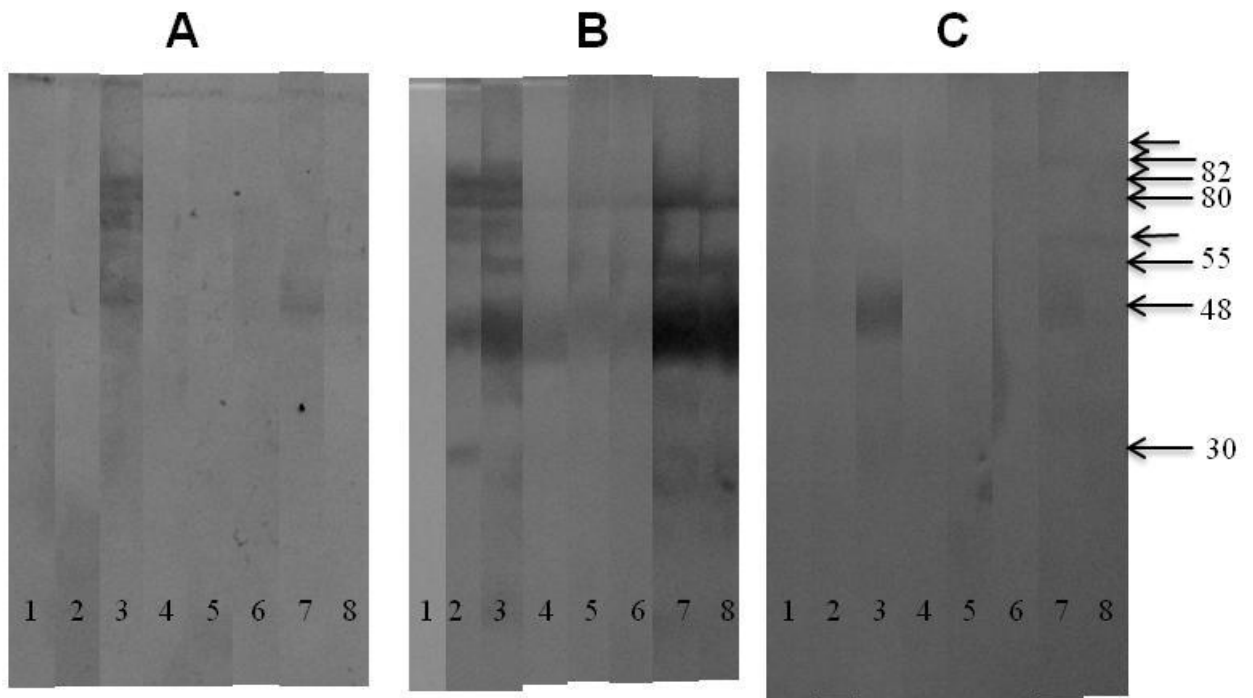


Figura 1. Imunoblotting de proteína total de *M. agalactiae* utilizando soros de ovinos vacinados com as vacinas experimentais 1 (A), 2 (B) e 3 (C). A numeração na fita corresponde aos dias após a 1ª dose da vacinação: 1: 1ª dose da vacina; 2: 21 dias pós-vacinação; 3: 35 dias pós-vacinação; 4: 90 dias pós-vacinação; 5: 150 dias pós-vacinação; 6: 210 dias pós-vacinação; 7: 270 dias pós-vacinação e 8: 360 dias pós-vacinação. Os pesos moleculares das proteínas em kDa estão indicados à direita.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A vacinação contra a agalaxia contagiosa é uma das medidas de controle mais eficientes. No Brasil, foram realizados os primeiros estudos com vacinas inativadas produzidas a partir de amostras de *M. agalactiae* locais, que conferiram proteção contra a agalaxia contagiosa em caprinos e ovinos.

As vacinas estudadas apresentaram resposta imune contra as proteínas de micoplasma, sendo as vacinas com adjuvantes oleosos mais eficientes. A proteína P48 foi imunodominante em todas as vacinas, podendo vir a ser utilizada em testes diagnósticos e vacinas.

6 ANEXOS

**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA ARQUIVO BRASILEIRO DE
MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

▪ **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

▪ **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

▪ **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

▪ O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

▪ Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

▪ **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.

2. o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.

- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

- **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.

- **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

- **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados.

Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

- **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

✓ *Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento.

As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

✓ *Figura.* Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
 - ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- *Citação de citação.* Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.
- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostrídios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$80,00, por página impressa em preto e R\$250,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA CIÊNCIA RURAL

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo .doc, .pdf).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo .doc, .pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo .doc, .pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICHS, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow dysplasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em:

<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.