



QUEDA NA PRODUÇÃO DE LEITE DE CABRA POR SURTO DE MICOPLASMOSE

Lídia Maria Marques dos Santos ¹; Camila Serva Pereira ¹; Leandro dos Santos Machado ¹;
Juliana Ferreira de Almeida ²; Elmiro Rosendo do Nascimento ³

1. Pós-Graduandos em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense.
2. Professora Doutora da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.
3. Professor Doutor da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense.

(l_msantos@yahoo.com.br) - Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ, Cep: 24.230-253, Brasil

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

A Micoplasmose caprina representa um fator limitante para a caprinocultura brasileira principalmente pela queda ou parada da produção de leite e elevada morte de crias. Caprinos acometidos por espécies patogênicas de micoplasmas podem desencadear sintomatologia clínica variada: artrite ou poliartrite, conjuntivite, linfadenite, peritonite, pericardite, mastite, septicemia, pneumonia e febre. O diagnóstico pela PCR apresenta vantagens em relação ao cultivo e isolamento, como o menor tempo para a obtenção de resultados, a sensibilidade e a especificidade na detecção de diferentes espécies de micoplasmas. O presente estudo objetivou a detecção de *Mycoplasma* spp. pela PCR genérica, utilizando o par de primers MGSO (TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC) e GPO-3 (GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T) com *amplicon* de 270 pb; detecção de *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) com a utilização dos primers MAGF (CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG) e MAGR (CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C), *amplicon* de 360 pb; e detecção de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) utilizando-se os primers MMMLC2-L (CAA TCC AGA TCA TAA AAA ACC T) e MMMLC1-R (CTC CTC ATA TTC CCC TAG AA), com *amplicon* de 1049 pb. As amostras clínicas analisadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária - UFF, 17 suabes de orofaringe e seis amostras de leite, foram provenientes de cabras durante um surto de pneumonia e agalaxia no Estado de Minas Gerais, Brasil. O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e submetido à PCR genérica e à PCR espécie-específica com a utilização de diferentes pares de *primers* e ciclos. Na PCR genérica houve visualização de *amplicons* de 270pb em todas as amostras testadas, enquanto na PCR específica os resultados foram negativos para *Ma* e *Mmc*. A detecção do agente a partir de espécimes clínicos permitiu maior rapidez no diagnóstico dessa doença, fundamental para a adoção de medidas de controle e profilaxia. Concluiu-se, então, que a agalaxia não foi ocasionada por *Ma*, mas por outra espécie de micoplasma, não testada nesse estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Micoplasma, leite de cabra, agalaxia, caprino.

DROP IN MILK PRODUCTION BY GOAT MYCOPLASMOSIS OUTBREAK

ABSTRACT

Goat Mycoplasmosis is a limiting factor for dairy goats, mainly by decrease or stop in milk production, besides high death rate of offsprings. Goats affected by pathogenic species of mycoplasma may develop clinical manifestations of arthritis or polyarthritis, conjunctivitis, lymphadenitis, peritonitis, pericarditis, mastitis, septicemia, pneumonia and fever. The diagnosis by PCR has advantages over isolation, as the shortest time to obtain results and higher sensitivity and specificity in detecting different species of mycoplasmas. The present study had the objective to carry out generic PCR to detect *Mycoplasma* spp., primers used and amplicon (MGSO: TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC and GPO3: GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T for 270 bp) and specific PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*) (MAGF: CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG and MAGR: CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C for 360 bp) and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) (MMMLC2-L: CAA TCC AGA TCA TAA AAA ACC T and MMMLC1-R: CTC CTC ATA TTC CCC TAG AA for 1049 bp). For diagnosis, there were used 17 oropharynx swabs and six milk samples from goats during an outbreak of pneumonia and agalactia in a herd of Minas Gerais state, Brazil. DNA was extracted by phenol-chloroform method and subjected to generic and species-specific PCR using different pairs of primers and cycles. As results, generic PCR yielded amplicons of 270 bp in all samples tested, while the specific PCR were negative for *Ma* and *Mmc*. Rapid detection of mycoplasma from clinical specimens prompt adoption of treatment, control measures and prophylaxis. It is concluded that the Agalactia was not due to *Ma*, but other mycoplasma species, different from those tested in this study.

KEYWORDS: Mycoplasma, goat milk, agalactia, goat.

INTRODUÇÃO

As micoplasmoses são enfermidades infecciosas de distribuição mundial, causadas por microrganismos da Classe Mollicutes e dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, que acometem diversas espécies de animais domésticos (COTTEW, 1979). Os micoplasmas diferenciam-se fenotipicamente de outras bactérias pelo pequeno tamanho (0,3-0,8 µm) e pela ausência de parede celular. Taxonomicamente esta última característica é usada para a separação destes microrganismos na classe Mollicutes (*mollis*, mole, *cútis*, pele, em latim) (RAZIN et al., 1998; SANTOS, 2009).

A micoplasmose caprina representa um fator limitante para a caprinocultura brasileira. Os caprinos acometidos por espécies patogênicas de micoplasmas podem desencadear sintomatologia clínica variada: artrite ou poliartrite, conjuntivite, linfadenite, peritonite, pericardite, mastite, septicemia, pneumonia e febre (AZEVEDO et al., 2006; ALMEIDA, 2009).

A Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC) causada pelo *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, e a Agalaxia Contagiosa dos Caprinos e Ovinos (ACCO), pelo *M. agalactiae*, são doenças de notificação obrigatória conforme estabelecido pela "World Organization for Animal Health" – OIE (2008), que ao lado de outras

micoplasmoses são reconhecidas mundialmente como causadoras de perdas econômicas vultosas, representadas principalmente pela morte de crias e pela redução ou parada da produção de leite (ALMEIDA, 2009).

O grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) agrupa espécies e subespécies que são conhecidas por provocar uma série de enfermidades em bovinos, caprinos e ovinos (OIE, 2008). O GMM constitui-se de seis espécies de micoplasmas estreitamente relacionadas em suas características bioquímicas e sorológicas e na filogenia do gene 16S r-RNA. As espécies e subespécies que constituem esse grupo são *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo SC (*MmmSC*), *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) e *M. bovine* Sorogrupo 7 (*Msp7-PG50*) (SANTOS, 2009). Contudo, *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC (*MmmLC*) e *M. mycoides* subsp. *capri* já haviam sido incluídos na mesma subespécie (VILEI et al., 2006).

Para o diagnóstico das micoplasmoses utiliza-se o isolamento e a identificação dos agentes infecciosos, realizados pelo cultivo em meios específicos contendo soro animal. Técnicas mais precisas, sensíveis e específicas, como a PCR, apresentam vantagens em relação ao cultivo e isolamento, como o menor tempo para a obtenção de resultados, aumentando a possibilidade de detecção de diferentes espécies de micoplasmas (CAMPOS, 2008).

O presente estudo objetivou a detecção de *Mycoplasma* spp. pela PCR genérica, além de *M. agalactiae* (*Ma*) e *M. mycoides* subsp. *capri* pela PCR espécie-específica de suabes de orofaringe e leite caprino.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras clínicas analisadas no Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária - UFF, 17 suabes de orofaringe e seis amostras de leite, foram provenientes de cabras durante um surto de pneumonia e agalaxia no Estado de Minas Gerais, Brasil. O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (SAMBROOK, 1989) e submetido à PCR genérica e à PCR espécie-específica com a utilização de diferentes pares de *primers* e ciclos.

A reação de amplificação do DNA foi realizada em termociclador Px2 Thermal Cycler. Para *Mycoplasma* spp. utilizou-se a seguinte programação: 94°C por 5 minutos; 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C por 10 minutos e término a 4°C. Para *Mycoplasma agalactiae*: 94°C por 5 minutos; 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 57°C por 1 minuto e extensão a 68°C por 1 minuto; extensão final a 70°C por 10 minutos e término a 4°C. Para *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* foi utilizado o ciclo: 96°C por 3 minutos; 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 49°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos; extensão final a 72°C por 5 minutos e término a 4°C.

Cada tubo de reação continha: 61,5 µL de água para PCR, 10µL de Tampão PCR 10X, 4µL de MgCl₂, 5µL de dNTPmix, 2U de Taq DNA polimerase e 2µL de cada *primer* (Prodimol Biotecnologia S/A). Para *Mycoplasma* spp. foram usados dois pares de *primers*: GPO-3 (5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T -3') e MGSO (TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC) para a reprodução de

amplicon de 270 pb (KUPPEVELD et al., 1992). Para *M. agalactiae* se utilizou os *primers* MAGF (CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG) e MAGR (CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C) com a geração de *amplicon* de 360 pb (CHÁVEZ-GONZÁLEZ, 1995). Para *M. mycoides* subsp. *capri* foram utilizados os *primers* MMMLC2-L (CAA TCC AGA TCA TAA AAA ACC T) e MMMLC1-R (CTC CTC ATA TTC CCC TAG AA), com *amplicon* de 1049 pb (MONNERAT et al., 1999).

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e a visualização dos *amplicons* foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na PCR genérica houve visualização de *amplicons* de 270pb em todas as amostras testadas (Figura 1), enquanto na PCR específica os resultados foram negativos para *Ma* e *Mmc*.

De acordo com a literatura, a agalaxia pode ser ocasionada por outros micoplasmas, além do *M. agalactiae* (OIE, 2008). Em caprinos, *Ma* é o agente clássico causador dessa enfermidade, embora *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*) e *M. putrefaciens* (*Mp*) também possam estar presentes (AZEVEDO et al., 2006; AMORES et al., 2011).

Por outro lado não é comum a visualização de problemas respiratórios em surtos ocasionados por *Ma*, sendo mais frequente, portanto, o aparecimento de agalaxia, mastite e poliartrite. Dessa forma, não é raro caprinos infectados por *Mmc* apresentarem pneumonia (GRECO et al., 2001; AZEVEDO et al., 2006).

Estudos adicionais estão em curso, a fim de elucidar a etiologia micoplásmica do presente surto.

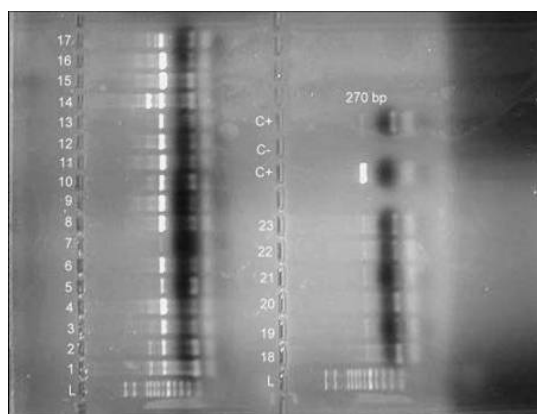


Figura 1 Gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado sobre luz UV. PCR de swab de orofaringe (1-17) e leite (18-23), sendo L: marcador DNA Ladder; 1 a 23: amostras positivas com bandas de 270 pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

CONCLUSÕES

O diagnóstico de micoplasmose por meio da PCR permitiu o controle imediato do surto em questão. Não houve confirmação de que a agalaxia foi devida ao *M. agalactiae*. Apesar de manifestações respiratórias presentes no rebanho afetado, não houve detecção de *M. mycoides* subsp. *capri*.

Outras espécies de micoplasmas, diferentes das testadas nesse estudo, podem causar as manifestações clínicas descritas e dessa forma, serem a causa etiológica desse surto.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à FAPERJ pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. F. **Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra in natura**. Niterói, 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

AMORES, J.; GÓMEZ-MARTÍN, A.; CORRALES, J. C.; SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; DE la FE, C. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in Spanish goat artificial insemination centres. **Theriogenology**, v. 75, p. 1265-1270, 2011.

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

CAMPOS, A. C. **ELISA proteína-G para o diagnóstico de Agalaxia Contagiosa dos ovinos e caprinos**. Recife, 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

CHÁVEZ-GONZÁLEZ, Y.; BASCUNANA, C. R.; BOLSKE, J. G.; MATTSON, J. B.; MOLINA, C. F.; JOHANSSON, K. E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 47, p. 183-190, 1995.

COTTEW, G. S. Caprine - ovine *Mycoplasmas*. In: TULLY, J. G.; WHITCOMB, R. F. *The Mycoplasmas*. Human and animal *Mycoplasmas*. **Academic Press**, London, p. 103-132, 1979.

GRECO, G.; CORRENTE, M.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, D. A multiplex-PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 21-25, 2001.

KUPPEVELD, 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.; MELCHERS, W. J. G. Genus and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2606-2615, 1992.

MONNERAT, M. P.; THIAUCOURT, F.; POVEDA, J. B.; NICOLET, J.; FREY, J. Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC e *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 2, p. 224-230, 1999.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE), Contagious Caprine Pleuropneumonia. In **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines**, 5 ed. 1000-12, 2008. Disponível em: <<http://www.oie.int>>.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning laboratory manual. Cold Spring Harbor, USA. 1989.

SANTOS, S. B. **Imunoperoxidase e métodos moleculares na detecção de *Mycoplasma* spp. (Mollicutes: *Mycoplasmataceae*) em conduto auditivo de bovinos e em *Raillietia* spp. (*Gamasida: Raillietidae*)**. Seropédica, 2009. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

VILEI, E. M.; KORCZAK, B. M.; FREY, J. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. **Veterinary Research**, v. 37, p. 779-790, 2006.