

Padronização e aplicação de ELISA indireto para diagnóstico de *Mycoplasma bovis* em amostras de soro sanguíneo bovino*

Samira Moraes Cunha de Mesquita¹⁺, Felipe Jansen Mansur², Elmiro Rosendo do Nascimento³, Maria Lúcia Barreto⁴ e Leda Maria Silva Kimura⁵

ABSTRACT. Mesquita S.M.C., Mansur F.J., Nascimento E.R., Barreto M.L. & Kimura L.M.S. [Standardization and application of indirect ELISA for diagnosis of *Mycoplasma bovis* in bovine blood serum samples.] Padronização e aplicação de ELISA indireto para diagnóstico de *Mycoplasma bovis* em amostras de soro sanguíneo bovino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 37(2):101-107, 2015. Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. E-mail: samira.veterinaria@gmail.com

International researchers presented results indicating frequent involvement of *Mycoplasma* spp. as a causative agent of mastitis in cattle, associating its presence with significant economic losses to farmers. *Mycoplasma bovis* is the species most reported and relevant, because it causes more severe disease. The level of antibodies against *M. bovis* remains high for several months and can be detected by ELISA. The aim of this work was to develop an indirect ELISA with whole cell antigen of *M. bovis* (strain Donetta PG 45) with subsequent application in bovine blood serum samples for detection of antibodies against *M. bovis*. The immunization of cows A and B by inoculating an immunogen against *M. bovis* to obtain hyperimmune blood serum was the first stage of this work, then the stage of standardization of ELISA was proceeded. The concentration of 2 µg of antigen/mL for coating the microtiter plates was decided by statistical analyses. The optical density value 0,2 was determined as the limit of reactivity discrimination of samples (the cut-off point). The hyperimmune blood serum sample of the cow A (collected 30 days after immunization) was chosen as the positive control and, the fetal calf serum was chosen as negative control of the assay. In addition, the ideal optimal dilutions found for blood serum samples was 1:400 and for conjugate was 1:10.000 and the substrate used was the ortho-phenylenediamine. The amount of 321 samples of cow blood serum from 15 farms was obtained for the application of the standardized indirect ELISA. It was diagnosed animals that have been exposed to *M. bovis* and the prevalence rate found in blood serum samples was 3,1% (10/321) and 46,7% (7/15) was the prevalence rate found between the corresponding farms studied.

KEY WORDS. *Mycoplasma bovis*, immunogen, ELISA, blood serum.

*Recebido em 4 de fevereiro de 2013.

Aceito para publicação em 17 de março de 2014.

¹ Médica-veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal), Universidade Federal Fluminense (UFF), Faculdade de Veterinária, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340, Brasil. *Autora para correspondência, E-mail: samira.veterinaria@gmail.com

² Médico-veterinário, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal), UFF, Faculdade de Veterinária, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340. E-mail: felipejansen@hotmail.com

³ Professor Associado, UFF, Faculdade de Veterinária, Rua Vital Brazil Filho, 64, Vital Brazil, Niterói, RJ 24230-340. E-mail: elmiro@vm.uff.br

⁴ Professora Adjunta, UFF, Campus Valonguinho, Núcleo de Animais de Laboratório, Outeiro São João Batista, Centro, Niterói, RJ 24020-141. E-mail: mlbarreto@gmail.com

⁵ Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Laboratório de Biologia Animal, Al. São Boaventura, 770, Fonseca, Niterói, RJ 24120-190. E-mail: lkimura@pesagro.rj.gov.br

RESUMO. Pesquisadores internacionais apresentaram resultados indicativos do envolvimento frequente de *Mycoplasma* spp. como agente causador de mastite em bovinos, associando sua presença com perdas econômicas significativas para os criadores. *Mycoplasma bovis* é a espécie mais relatada e relevante, pois causa doença mais grave. Os níveis de anticorpos contra *M. bovis* permanecem elevados por muitos meses e podem ser detectados pelo ELISA. O objetivo do presente trabalho foi a padronização de ELISA indireto com antígeno celular total de *M. bovis* (cepa Donetta PG 45) com subsequente aplicação em amostras de soro sanguíneo de vacas para detecção de anticorpos anti-*M. bovis*. A imunização das vacas A e B, para obtenção de soro sanguíneo com imunógeno contra *M. bovis* foi a primeira etapa do trabalho. Em seguida, procedeu-se à etapa de padronização do ELISA indireto e após serem realizadas análises estatísticas, optou-se por utilizar a concentração de 2 µg de antígeno/mL para sensibilização das placas de microtitulação. O valor de densidade ótica 0,2 foi estabelecido como limite de discriminação de reatividade das amostras (ponto de corte). Foi escolhido como controle positivo dos ensaios a amostra de soro sanguíneo da vaca A (coletado 30 dias após a imunização) e, como controle negativo dos ensaios foi escolhido o soro fetal bovino estéril. Além disso, as diluições consideradas ideais para as amostras de soro sanguíneo e para o conjugado utilizado foram respectivamente 1:400 e 1:10.000 e o substrato utilizado foi o Orto- fenilenediamina. Para a aplicação do ELISA indireto foram obtidas 321 amostras de soro sanguíneo de vacas de 15 fazendas. Na aplicação do ELISA indireto padronizado, foram diagnosticados animais que já foram expostos a *M. bovis* e as prevalências encontradas foram 3,1% (10/321) nas amostras de soro sanguíneo e 46,7% (7/15) entre as respectivas fazendas estudadas.

PALAVRAS-CHAVE. *Mycoplasma bovis*, imunógeno, ELISA, soro sanguíneo.

INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial e o desempenho produtivo de um rebanho depende, dentre outros fatores, da eficácia de diversas medidas profiláticas. Entretanto, ainda existem criatórios que não dispõem de um controle sanitário eficaz de seu rebanho, refletindo em gastos com medicamentos e assistência veterinária, redução da cadeia produtiva e alta morbidade e mortalidade de animais.

A mastite é a inflamação da glândula mamária

e está entre as enfermidades de maior importância para o rebanho bovino leiteiro no Brasil. Pesquisadores internacionais apresentaram resultados indicativos do envolvimento frequente de *Mycoplasma* spp. como agente causador de mastite em bovinos, associando sua presença com perdas econômicas significativas para os criadores.

A mastite causada por micoplasmas é agressiva e muitas vezes refratária ao tratamento. Além da queda de produção do leite, pode ocorrer também um espessamento deste com perda de fluidez, presença de secreção aquosa que pode progredir para um exsudato purulento. As espécies mais relatadas são *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma bovis*, porém a espécie *Mycoplasma bovis* se destaca pela alta casuística e gravidade da doença (Walker 2003). A detecção sorológica de anticorpos contra *M. bovis* é considerada um método de diagnóstico confiável já que os níveis de anticorpos permanecem elevados por muitos meses e podem ser detectados por ELISA indireto.

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

O objetivo do presente estudo foi a padronização de ELISA indireto com antígeno celular total de *M. bovis* (cepa Donetta PG45) com subsequente aplicação em ensaios utilizando amostras de soro sanguíneo de vacas para detecção de anticorpos anti-*M. bovis*.

MATERIAL E MÉTODOS

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

A primeira etapa da padronização do ELISA indireto consistiu na imunização de 2 vacas (sem histórico clínico de enfermidades causadas por micoplasmas), que foram nomeadas de vaca A e vaca B, através da inoculação por via subcutânea do imunógeno (inativado com formaldeído P.A.) contra *M. bovis* emulsionado com adjuvante incompleto de Freund, para obtenção do soro sanguíneo hiperimune que seria utilizado como controle positivo do ensaio. O protocolo utilizado para imunização dos

animais foi baseado em relatos de Chima et al. (1981), Howard et al. (1982) e Araújo et al. (2003). As coletas de sangue dos animais para obtenção do soro sanguíneo hiperimune foram realizadas antes da imunização (para verificação prévia da condição imunológica de cada animal) e nos intervalos de 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização. Amostras de soro sanguíneo resultantes de cada coleta foram submetidas ao teste de inibição de crescimento (Goll 1994, Liberal 1994) e ao ELISA para avaliação da produção de anticorpos contra *M. bovis*.

Os procedimentos adotados para a padronização do ELISA indireto são baseados em relatos de elaboração de ELISA para detecção indireta de micoplasmas causadores de enfermidades em animais, descritos por Cassell & Brown (1983), Liberal & Boughton (1992), Nicolet & Martel (1996) e Campos et al. (2000). O ELISA indireto foi padronizado para detecção de anticorpos anti-*M. bovis*, utilizando-se placas de microtitulação (Kartell S.P.A.[®]), soros sanguíneos hiperimunes produzidos nas vacas A e B como controles positivos do ensaio, soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo das vacas A e B antes da imunização com o imunógeno inativado contra *M. bovis* como controle negativo do ensaio, Imunoglobulina G de coelho anti-Imunoglobulina G de bovino conjugada à peroxidase (Sigma-Aldrich[®]) e substrato cromogênico Orto-fenilendiamina (OFD). Em todos os ensaios também foram incluídos controle do substrato (poço da placa de microtitulação em que foi colocado somente o antígeno e o substrato), controle do conjugado (poço da placa de microtitulação em que foi colocado somente o antígeno, conjugado e substrato) e todos os valores foram obtidos em duplicata, para avaliação da repetibilidade do ensaio.

A cepa de referência *M. bovis* Donetta PG 45 foi cultivada em meio A, para obtenção do antígeno a ser utilizado na etapa de sensibilização das placas de microtitulação. A concentração protéica do antígeno *M. bovis* foi mensurada pelo método de Lowry et al. (1951). As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 50 µL por poço de antígeno celular total de *M. bovis* contendo as concentrações proteicas de 2 µg antígeno/mL e 16 µg antígeno/mL. As diferentes concentrações proteicas foram obtidas através da diluição do antígeno celular total em solução tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6). Essas placas de microtitulação foram incubadas a 4°C "overnight". Após este período, as referidas placas foram lavadas por três vezes com solução salina tamponada com fosfato, adicionada de 0,05% de Tween[®] 20.

As amostras de soro sanguíneo das vacas A e B antes da imunização (para verificação prévia da condição imunológica de cada animal), as amostras de soro sanguíneo das vacas A e B coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização (controles positivos) e a amostra de soro fetal bovino estéril comercial (controle negativo) foram diluídos na base 2, com diluições de 1:100 a 1:3.200, em solução salina tamponada com fosfato. Após a incubação das placas em estufa à temperatura de 37°C pelo período de duas horas, estas foram lavadas três ve-

zes com solução salina tamponada com fosfato adicionada de 0,05% de Tween[®] 20, para a realização da próxima etapa seguinte.

A diluição da Imunoglobulina G de coelho anti-Imunoglobulina G de bovino conjugada à peroxidase (conjugado) utilizada foi 1:10.000 em solução salina tamponada com fosfato. Essa etapa foi realizada com a adição de 50 µL do conjugado diluído em cada poço da placa para microtitulação. Em seguida, as placas de microtitulação foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C por uma hora e, foram lavadas como já descrito anteriormente.

O substrato cromogênico OFD foi diluído numa solução tampão preparada imediatamente antes do uso, utilizando-se os seguintes reagentes: água destilada, solução de ácido cítrico 0,1 M, solução de fosfato de sódio 0,2 M e peróxido de hidrogênio. O volume de 50 µL do substrato diluído foi adicionado em cada poço das placas de microtitulação, as quais foram incubadas à temperatura ambiente, na ausência de luz, por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 3 N, por poço, e as absorbâncias foram verificadas em espectrofotômetro (DNM-9602 microplate reader[®]) com filtro de 492 nm.

Para a determinação do limite de discriminação de reatividade das amostras (ponto de corte) foi considerada como base a média do valor de absorbância dos soros sanguíneos negativos (amostra de soro fetal bovino estéril comercial e amostras de soro sanguíneo das vacas A e B não imunizadas com o imunógeno contra *M. bovis*), a qual foi multiplicada por 2,5 para estabelecimento do ponto de corte (Onoviran & Robinson 1979, Cassell et al. 1996).

Para a aplicação do ELISA indireto, 321 amostras de soro sanguíneo de vacas com idade superior a 24 meses e oriundas de 15 propriedades do município de Carmo, Estado do Rio de Janeiro, foram submetidas ao ensaio. Essas amostras pertenciam ao banco de soro do Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO) e foram gentilmente cedidas para este trabalho. As referidas amostras foram coletadas nos anos de 2010 e 2011 para serem submetidas ao diagnóstico de brucelose, no qual se obteve resultado negativo.

No presente trabalho foram utilizadas as seguintes análises estatísticas para avaliar os resultados obtidos (Sampaio 2002): O teste t de Student foi utilizado durante a padronização do ELISA para avaliar a significância estatística dos valores de Densidade Ótica (D.O.) obtidos da amostra que seria considerada como controle negativo, das amostras coletadas das vacas A e B assim como para determinar a concentração de antígeno que seria usada para sensibilizar as placas para microtitulação; Cálculos de média e coeficiente de variação para estimar variações das D.O. obtidas das amostras testadas e, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para analisar a frequência de amostras positivas e a frequência de amostras negativas entre as fazendas estudadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de soro fetal bovino estéril comercial e as amostras de soro sanguíneo coletadas antes da imunização das vacas A e B foram submetidas ao teste de inibição de crescimento e foi constatada ausência de zona de inibição de crescimento de colônias de *M. bovis*, indicando a ausência de anticorpos anti-*M. bovis* nessas amostras. As amostras de soro sanguíneo coletadas 21 dias, 30 dias e 60 dias após a imunização das vacas A e B, também foram submetidas a teste de inibição de crescimento e foi constatada a presença de zona de inibição de crescimento de colônias de *M. bovis*, indicando a presença de anticorpos anti-*M. bovis* nessas amostras, confirmando o sucesso da imunização realizada. A próxima etapa foi a submissão de todas as amostras mencionadas, aos testes de padronização do ELISA indireto.

Após a execução do ELISA foram observadas diferenças entre as D.O. das diferentes amostras de soro sanguíneo demonstrando que ocorreu uma progressão da produção de anticorpos nas vacas imunizadas até 30 dias após a imunização e uma queda da produção de anticorpos aos 60 dias após a imunização (Figuras 1, 2, 3 e 4). Embora tenha sido evidenciado através dos testes de inibição de crescimento e do ELISA que as 2 vacas tiveram resposta imunológica frente ao imunógeno inoculado, foi constatado através do teste t de Student que havia diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores de D.O. das amostras de soro sanguíneo das vacas A e B, encontrados durante a etapa de padronização dos ensaios. Portanto, optou-se pela utilização da amostra de soro sanguíneo da vaca A coletadas 30 dias após a imunização porque esta apresentou a maior D.O. dentre todas as amostras testadas e seriam ideais para serem usadas como controles positivos dos ensaios que seriam executados, conforme relatos de Howard (1982).

Após a submissão da amostra de soro fetal bovino estéril comercial ao ELISA, foi verificado que

esta apresentava baixa D.O. (próxima ao valor zero), em concordância com a boa relação entre os testes executados descrita por Liberal & Boughton (1994), e indicando que essa amostra seria o controle negativo ideal para os ensaios que seriam executados. A constatação da ausência de anticorpos anti-*M. bovis* verificada nas amostras de soros sanguíneos obtidos das vacas antes da imunização e a baixa D.O. quando essas amostras foram submetidas ao ELISA, demonstra que os animais escolhidos realmente não tinham sido infectados por *M. bovis*, garantindo o sucesso da hiperimunização e, é também um resultado compatível com relatos de Howard et al. (1982). Se fossem obtidos, antes da imunização, resultados compatíveis com infecção por *M. bovis* nos animais escolhidos, estes seriam substituídos.

Para sensibilização das placas de microtitulação, observou-se que o aumento da concentração de antígeno não implicou em aumento da reação antígeno-anticorpo com conseqüente aumento da D.O. Foi constatado através do teste t de Student que não havia diferença estatística ($p > 0,05$) entre os valores de D.O. das amostras de soro sanguíneo testadas nas concentrações de antígeno testadas, portanto optou-se por utilizar a menor concentração de antígeno (2 µg/mL). A diferença de D.O. dentre as amostras de soro sanguíneo foi observada apenas entre as diferentes diluições utilizadas, 1/100 a 1/3.200, (Figuras 1, 2, 3 e 4). Nas placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL, a amostra de soro fetal bovino estéril comercial apresentou a menor D.O. observada e a amostra de soro sanguíneo da vaca A obtida 30 dias após a inoculação do imunógeno contra *M. bovis* apresentou a maior D.O. observada dentre as diluições das amostras testadas. (Figura 1).

A diluição considerada ideal para as amostras de soro sanguíneo foi a diluição de 1:400 assim como descrito por Campos et al. (2000) que também utilizaram antígeno celular total para a

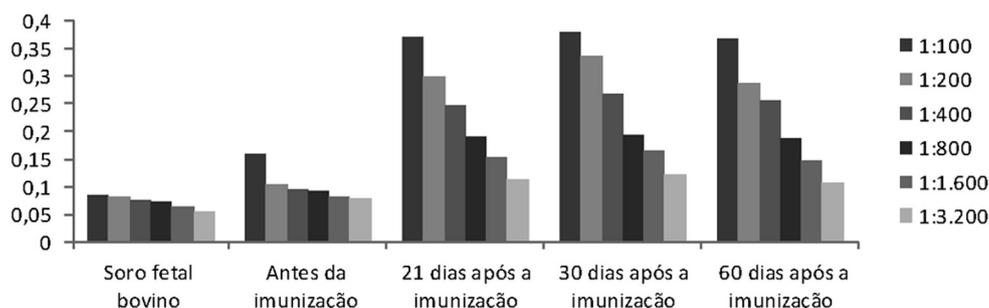


Figura 1. Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo da vaca A diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL.

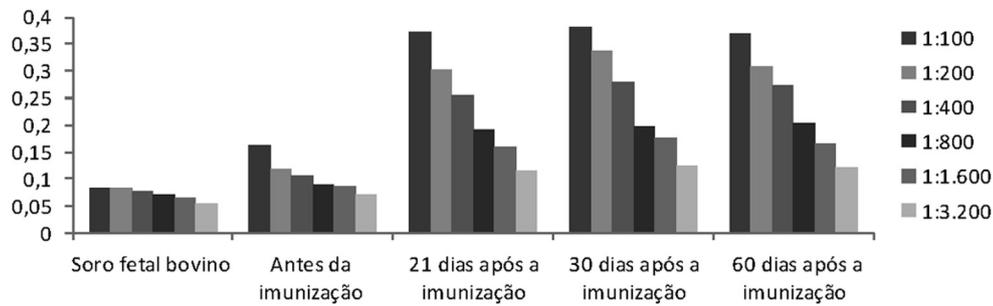


Figura 2. Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo da vaca A diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 16 mg de antígeno/mL.

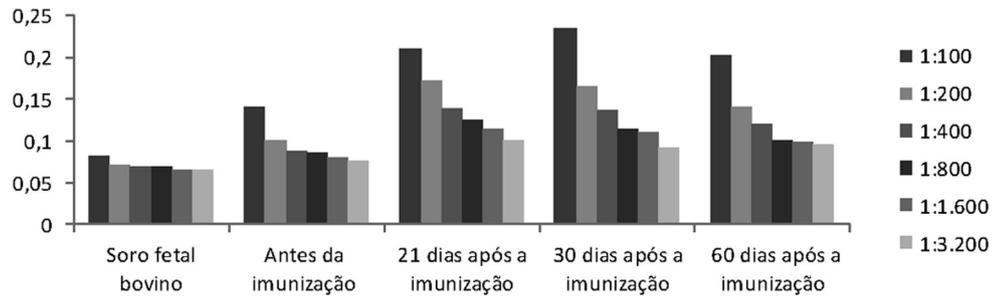


Figura 3. Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo da vaca B diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 2 µg de antígeno/mL.

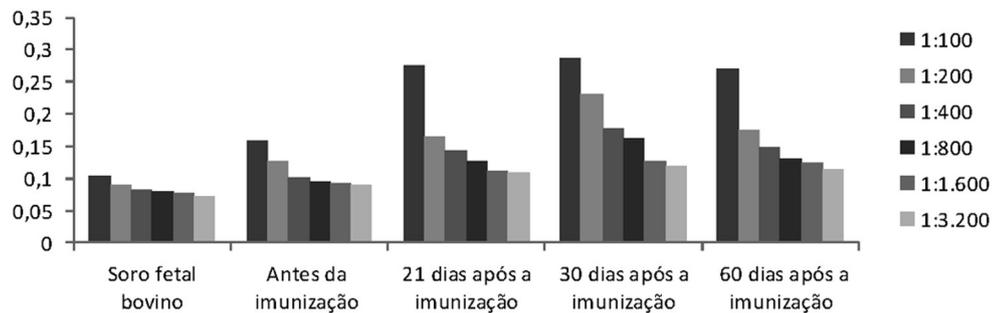


Figura 4. Densidades óticas das amostras de soro fetal bovino estéril comercial e soro sanguíneo da vaca B diluídos 1:100 a 1:3.200 em solução salina tamponada com fosfato em placas sensibilizadas com 16 µg de antígeno/mL.

sensibilização das placas de microtitulação. Esta foi a maior diluição em que foi observado que a amostra de soro sanguíneo da vaca A obtida 30 dias após a inoculação do imunógeno contra *M. bovis* apresentava valor acima de 0,2 (Howard et al. 1982). O valor 0,2 foi determinado como ponto de corte por ser 2,5 vezes a média das D.O. das amostras de soro sanguíneo consideradas como negativas. Esse ponto de corte indica que as amostras testadas na etapa de aplicação do ensaio que apresentassem D.O. com valor acima de 0,2 seriam consideradas resultado positivo/presença de anticorpos anti-*M. bovis*, enquanto as amostras de soros sanguíneos testadas que apresentassem D.O. com valor abaixo de 0,2 seriam consideradas resultado negativo/ausência de anticorpos anti-*M. bovis*.

A diluição do conjugado (1:10.000) e o substrato utilizado demonstraram ser adequados para os ensaios e não foram observadas reações inespecíficas, o que está em concordância com resultados obtidos por Campos et al. (2000). Os controles do substrato e do conjugado foram utilizados em todos os ensaios e não apresentaram reação tanto visualmente quanto na verificação da D.O. após ser realizada a leitura das placas do ELISA em espectrofotômetro, de acordo com recomendações de Cassell & Brown (1983). O valor de D.O. encontrado foi aproximadamente 0,06 em ambos, durante a execução de todos os ensaios.

Com o objetivo de monitorar os valores de D.O. do controle positivo (Amostra de soro sanguíneo da vaca A, coletadas 30 dias após a imunização) e do controle negativo utilizados durante a aplicação

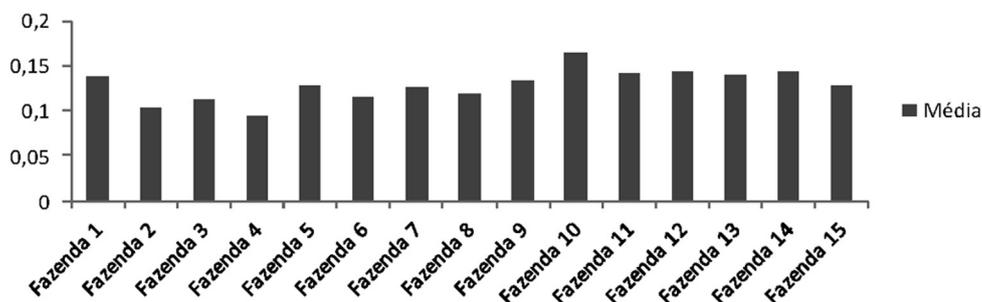


Figura 5. Valores das médias de D.O. das amostras de soro sanguíneo, divididas por fazenda.

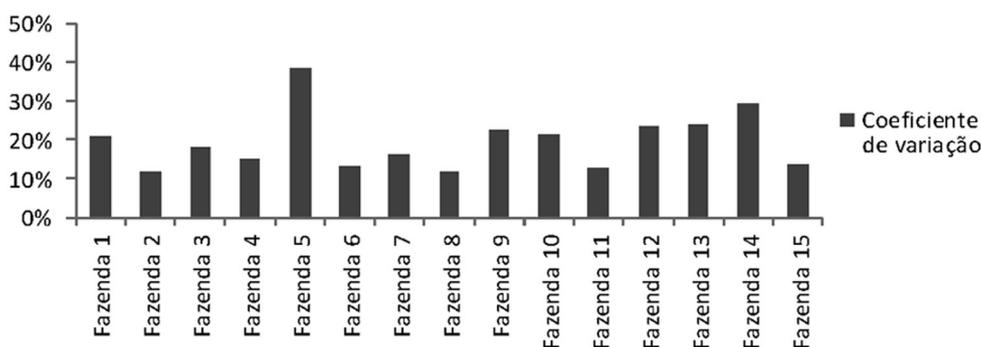


Figura 6. Valores de coeficiente de variação de D.O. das amostras de soro sanguíneo, divididos por fazenda.

do ELISA indireto (amostra de soro fetal bovino estéril comercial), foi calculado o coeficiente de variação após o término da execução destes. O valor obtido do coeficiente de variação para o controle positivo foi 7% e, o valor obtido do coeficiente de variação para o controle negativo foi 4,5%, o que significa que os valores de D.O. obtidos foram similares, demonstrando a boa escolha dos controles assim como mencionado por Liberal & Boughton (1992).

Para avaliar a variação da resposta imunológica dentre os animais de cada fazenda, foram calculadas a média e o coeficiente de variação. Nas Figuras 5 e 6 estão expostos os resultados obtidos. Dentre o total de animais testados, o coeficiente de variação foi de 25,8%.

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

O resultado total (Tabela 1) da aplicação do ELISA indireto com as 321 amostras de soro sanguíneo de vacas demonstra baixa prevalência (3,1%) de *M. bovis* entre os indivíduos estudados, assim como relatado por Pretto et al. (2001), entretanto nota-se que em 46,7% das fazendas foram diagnosticados animais que já foram expostos ao microrganismo

em questão. O alto índice de prevalência entre as fazendas estudadas merecem atenção, pois as vias de transmissão de *M. bovis* são principalmente por contato direto e possivelmente, transmissão por via congênita (Pfützner & Sachse 1996).

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

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

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

CONCLUSÃO

A padronização do ELISA indireto para detecção de anticorpos anti- *M. bovis* em amostras de soros sanguíneos apresentou parâmetros satisfatórios e houve boa relação dos resultados obtidos no ensaio com os resultados do teste de inibição de crescimento consequentemente, foi possível realizar a submissão de 321 amostras de soro sanguíneo de vacas ao ensaio. Na aplicação do ELISA indireto padronizado, foram diagnosticados animais que já foram expostos a *M. bovis*. A prevalência dentre os animais estudados foi baixa, porém a prevalência entre as fazendas foi considerável.

REFERÊNCIAS

- Araújo J.I., Timenetsky J. & Ávila F.A. Avaliação da imunogenicidade de uma vacina experimental obtida a partir de *Mycoplasma pulmonis* isolado de ratos (*Rattus norvegicus*) naturalmente infectados. *Ars Vet.*, 19:80-86, 2003.
- Campos C.A.M., Nascimento E.R., Barreto M.L., Nascimento M.G.F. & Verícimo M.A. ELISA para o diagnóstico das infecções por *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritis* em *Rattus norvegicus* de Biotério. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 22:207-210, 2000.
- Cassell G.H. & Brown M.B. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of anti-mycoplasmal antibody, p.457-469. In: Razin S. & Tully J.G. (Eds), *Methods in Mycoplasma Characterization*. v.1. Academic Press, New York, 1983.
- Cassell G.H., Gambill G. & Duffy L. ELISA in respiratory infections of humans, p.123-136. In: Tully J.G. & Razin S. (Eds), *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. v.2. Academic Press, San Diego, 1996.
- Chima J.C., Wilkie B.N., Nielsen K.H., Ruhnke H.L., Truscott R.B., Maxie G. & Chick B. Synovial Immunoglobulin and antibody in vaccinated and nonvaccinated calves challenged with *Mycoplasma bovis*. *Can. J. Comp. Med.*, 45:92-96, 1981.
- Goll F.J. Identification of mycoplasmas isolated from domestic animals, p.22-23. In: Whitford H.W., Rosenbusch R.F. & Lauerma L.H. (Eds), *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. 1st ed. Iowa State University Press, Ames, 1994.
- Howard C.J., Gourlay R.N., Thomas L.H. & Eynon J. Antibodies, by ELISA, to mycoplasmas in bovine sera, p.90-101. In: Wardley R.C. & Crowther J.R. (Eds), *The ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis* (Current topics in veterinary medicine and animal science). v.22. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1982.
- Liberal M.H.T. & Boughton E. Comparison between Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Disc Film Inhibition and Complement Fixation tests for the diagnosis of *Mycoplasma bovis*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 29:823-830, 1994.
- Liberal M.H.T. & Boughton E. Standardization of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the serodiagnosis of *Mycoplasma bovis*. *Rev. Microbiol.*, 23:146-150, 1992.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. Protein measurement with the phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- Nicolet J. & Martell J.L. ELISA in large animals, p.105-113. In: Tully J.G. & Razin S. (Eds), *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. v.2. Academic Press, San Diego, 1996.
- Onoviran O. & Robinson D.T. Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* in cattle by an enzyme linked immunosorbent assay. *Vet. Rec.*, 105:165-167, 1979.
- Pfützner H. & Sachse K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev. Sci. Techn.* (International Office of Epizootics), 15:1477-1494, 1996.
- Pretto L.G., Muller E.E., Freitas J.C., Mettífogo E., Buzinhani M., Yamaguti M. & Salvador R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesq. Vet. Bras.*, 21:143-145, 2001.
- Sampaio I.B.M. *Estatística Aplicada a Experimentação Animal*. 2^a ed. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 2002. 265p.
- Walker R.L. Mollicutes, p.155-158. In: Hirsh E.C. & Zee Y.C. (Eds), *Microbiologia Veterinária*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.