



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

JÚLIO CÉSAR BRAGA DE SOUZA

Análise e seleção de proteínas antigênicas de *Mycoplasma bovis* na busca de candidatos vacinais ou diagnóstico

Vitória da Conquista – BA

2023

JÚLIO CÉSAR BRAGA DE SOUZA

Análise e seleção de proteínas antigênicas de *Mycoplasma bovis* na busca de candidatos vacinais ou diagnóstico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky
Universidade de São Paulo – USP

Vitória da Conquista, BA
2023

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

S729

Souza, Júlio César Braga de.

Análise e seleção de proteínas antigênicas de *Mycoplasma bovis* na busca de candidatos vacinais ou diagnóstico/ Júlio César Braga de Souza. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2023.

90 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques.

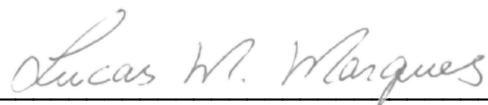
Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2023.

JÚLIO CÉSAR BRAGA DE SOUZA

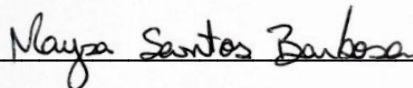
ANÁLISE E SELEÇÃO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DE *Mycoplasma bovis* NA BUSCA DE CANDIDATOS VACINAIS OU DIAGNÓSTICO

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

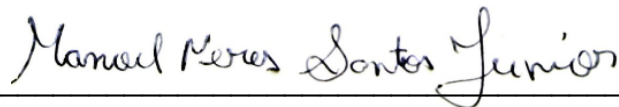
Vitória da Conquista – BA, 12/05/2023.



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Orientador)
(Universidade Federal da Bahia)



Prof^a. Dr^a. Maysa Santos Barbosa (Examinadora)
(Provax Biotecnologia)



Prof. Dr. Manoel Neres Santos Júnior (Examinador)
(UniFTC)

Aos meus pais, por tudo que me ensinaram tornando-me o que sou hoje, pelo amor, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado o presente da vida, saúde, sabedoria e disposição para cumprir mais um importante ciclo da minha vida.

Para chegar até a conclusão de momentos como estes, torna-se necessário abdicar de muitas coisas e momentos em nossas vidas. Com isso, contamos com o apoio e compreensão daqueles que nos cercam. Assim, agradeço aos meus pais Núbia e Osmário pelo apoio, por confiarem que eu seria capaz de chegar até aqui, por tantos momentos que entenderam a minha ausência. Meu amor por vocês é incondicional. Agradeço aos meus familiares, irmã e sobrinhos, vocês foram fundamentais nesta caminhada, vocês foram a válvula de escape, o ponto de paz. Amo vocês!

Ao meu namorado Iago, minha eterna gratidão. Antes mesmo de chegar até aqui você sonhou todos estes momentos comigo. Obrigado pelos momentos dedicados a me ouvir, por quantas vezes as coisas dessem errado. Obrigado pela compreensão da ausência e, mesmo com a distância física ter sido presente. Sem dúvidas você fez parte dessa conquista. Te amo!

Aos amigos que fiz durante toda minha jornada na UFBA, biologia 2015.1 (que são presentes mesmo após concluirmos a graduação), biociências 2020.1. Em especial à Vinícius e Laryana, vocês foram fundamentais, trazendo leveza, conselhos e boas risadas. Foi muito bom dividir esta etapa com vocês.

Aos integrantes do Projeto Micro, pela troca de conhecimentos e conselhos. Principalmente, “as recombinantes” pela jornada diária, os socorros, desabafos, e principalmente as risadas, vocês permitiram um laboratório mais alegre. À Bruna Carolina, agradeço por tudo, pelos momentos doados a me ensinar, por ter me ajudado a concluir essa etapa, pelos conselhos e encorajamento. Por todos os cafés, memes, conversas compartilhadas. Serei eternamente grato!

À Banca examinadora, eu agradeço por aceitarem o convite e pelo tempo depositados para correção do meu trabalho, de antemão agradeço pelas considerações que tenho certeza que só enriquecerá o meu trabalho.

Aos mestres que com toda certeza são partes de minha vitória, construção profissional e pessoal, fica a minha eterna gratidão. Ao meu orientador Lucas Marques, agradeço pela confiança a mim creditada, por tudo que me ensinou e inspirou, por todas as orientações e compreensão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro indispensável.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho, todo meu carinho e amor.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

DE SOUZA, J. C. B. **Análise e seleção de proteínas antigênicas de *Mycoplasma bovis* na busca de candidatos vacinais ou diagnóstico.** Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

Mycoplasma bovis é um dos principais agentes etiológicos em bovinos e está presente principalmente em infecções como mastite, doenças respiratórias e artrite. O tratamento dessas doenças é limitado. Assim, a prevenção demonstra ser uma importante alternativa. Contudo, no Brasil não se tem dados sobre vacinas eficazes comercializadas contra o *M. bovis*. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi a análise e seleção de proteínas conservadas em *M. bovis*, para a validação e aplicação em vacinas e teste imunodiagnóstico. Os proteomas foram obtidos através do banco de dados Uniprot, seguindo da seleção dos alvos por ferramentas de bioinformática. As proteínas foram avaliadas utilizando PsortB e TopCons para predições de regiões transmembrânicas e peptídeo sinal. Foi avaliada ainda a homologia entre os dois proteomas não redundantes de *M. bovis* disponíveis no Uniprot, através do programa público CD-HIT. Para a predição de epítomos foi utilizado o consenso de ferramentas dispostas no IEDB, para a predição de epítomos de células B, e a utilização de NETMHCcons e NETMHCIIpan 3.1 para as predições de epítomos de células T, apresentados em vias de MHCI e MHCII, respectivamente. As proteínas selecionadas por bioinformática foram então, clonadas e expressas em células de *Escherichia coli*. Após a purificação, as proteínas foram avaliadas quanto a antigenicidade e validadas a partir de ensaios de *dot blotting* com soros de coelho sabidamente imunizados com *M. bovis*. A proteína A0A0Y59Y3U4 foi predita pelo consenso entre as ferramentas de bioinformática, como bom alvo ao estudo. A otimização da expressão desta seguiu com a utilização de seis estirpes de *E. coli*. Entretanto, quatro dessas (Arctic, pLysS, BL21 e C41) apresentou resultado significativo, sendo a C41, apresentando o melhor rendimento. Após a purificação, a proteína foi então submetida à avaliação de reatividade contra soros sabidamente infectados com *M. bovis*, onde a proteína reagiu aos soros testados. Com isso, os resultados obtidos no presente estudo abrem-se margem para avançar com os estudos utilizando esta proteína em etapas de experimentação animal em busca de um candidato vacinal e diagnóstico efetivos para o controle dessa enfermidade.

Palavras-chave: *M. bovis*; imunodiagnóstico; infecções bovinas; proteína recombinante; vacinologia reversa.

ABSTRACT

DE SOUZA, J. C. B. **Analysis and selection of antigenic proteins from *Mycoplasma bovis* in the search for vaccine candidates or diagnosis.** Dissertation (Master's in Biosciences) - Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

Mycoplasma bovis is one of the main etiological agents in cattle and is primarily associated with infections such as mastitis, respiratory diseases, and arthritis. The treatment of these diseases is limited, making prevention an important alternative. However, in Brazil, there is a lack of data on commercially available effective vaccines against *M. bovis*. Therefore, the objective of this study was to analyze and select conserved proteins in *M. bovis* for validation and application in vaccines and immunodiagnostic tests. The proteomes were obtained from the Uniprot database, followed by target selection using bioinformatics tools. The proteins were evaluated using PsortB and TopCons for the prediction of transmembrane regions and signal peptides. The homology between the two non-redundant *M. bovis* proteomes available in Uniprot was also assessed using the public program CD-HIT. Epitope prediction was performed using a consensus of tools available in the IEDB for B-cell epitope prediction, and NETMHCcons and NETMHCIIpan 3.1 for T-cell epitope prediction presented in the context of MHCI and MHCII pathways, respectively. The proteins selected by bioinformatics were then cloned and expressed in *Escherichia coli* cells. After purification, the proteins were evaluated for antigenicity and validated through dot blotting assays using serum from rabbits known to be immunized with *M. bovis*. Protein A0A0Y59Y3U4 was predicted as a promising target by the consensus of bioinformatics tools. The optimization of its expression was carried out using six *E. coli* strains, with four of them (Arctic, pLysS, BL21, and C41) showing significant results, and C41 demonstrating the best yield. After purification, the protein was subjected to reactivity evaluation against sera known to be infected with *M. bovis*, and it showed reactivity with the tested sera. These findings open up possibilities to advance studies using this protein in animal experimentation stages, aiming to develop effective vaccine candidates and diagnostics for the control of this disease.

Keywords: *M. bovis*; immunodiagnosis; bovine infections; recombinant protein; reverse vaccinology.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ATP: Adenosina Trifosfato

BRD: Doenças Respiratrias Bovinas

BRDC: Complexo de Doença Respiratória Bovina

BSA: Soro albumina bovina

°C: Grau Celsius

CO₂: Gs Carbnico

DNA: cido Desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio de Imunoabsoro Enzimtica

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IL-17: Interleucina 17

IPTG: isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida

LB: Luria Bertani

μ L: Microlitro

μ g: Micrograma

μ m: Micrometro

mL: Mililitro

mM: Milimolar

M: Molar

MHCI: Molécula do complexo de histocompatibilidade de classe 1

MHCII: Molécula do complexo de histocompatibilidade de classe 2

ng: Nanograma

nm: Nanometro

pb: Pares de Base

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PBMC: Célula Mononuclear de Sangue Periférico

PBS-T: Tampão Fosfato Salina – Tween

pH: Potencial Hidrogeniônico

qPCR: Reação em Cadeira da Polimerase Quantitativa

RPM: Rotação por minuto

rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossômico

SDS-PAGE: Sulfato Dodecil de Sódio – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Th1: T auxiliar tipo 1

Th2: T auxiliar tipo 2

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

Figura 1: Proteínas preditas como proteína de membrana, submetidas ao NETMHC II afim de prever as ligações dos peptídeos ao MHC de classe dois.

Artigo

Figura 1: Fluxograma representativo das etapas de análise do proteoma de *M. bovis*, através de ferramentas de bioinformática e a seleção de proteínas de acordo características estabelecidas como preferenciais para cada teste realizado.

Figura 2: Estruturas tridimensionais das proteínas preditas pelo I-TASSER.

Figura 3: Expressão da proteína A0A059Y3U4. Visualização em SDS-PAGE e Western blotting

Figura 4: Purificação da proteína A0A059Y3U4. Visualização em SDS-PAGE e Western blotting

Figura 5: Análise de reatividade da proteína A0A059Y3U4 contra soros de coelhos sabidamente contaminados com *M. bovis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das proteínas, utilizadas como filtro de seleção e informações de conhecimento como patogenicidade e ontologia gênica.

Tabela 2: Características físico-químicas de proteínas alvos vacinais contra *M. bovis*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. <i>Mollicutes</i>	19
2.2. Gênero <i>Mycoplasma</i>	19
2.2.1. Características gerais do gênero <i>Mycoplasma</i>	19
2.3. <i>Mycoplasma bovis</i>	21
2.3.1. Características gerais de <i>M. bovis</i>	21
2.4. Patogenicidade de <i>M. bovis</i>	22
2.4.1. Mastite bovina por <i>M. bovis</i>	23
2.4.2. Papel de <i>M. bovis</i> no complexo de doenças respiratórias bovina	25
2.4.3. Doenças menos frequentes relacionadas ao <i>M. bovis</i>	26
2.5. Diagnóstico de <i>M. bovis</i>	27
2.5.1. Cultivo	27
2.5.2. Método sorológico	28
2.5.3. Métodos moleculares	29
2.6. Tratamento, controle e prevenção	31
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Análises de bioinformática	37
4.1.1. Obtenção dos proteomas	37
4.1.2. Predição de localização subcelular e estruturas secundárias	37
4.1.3. Agrupamento de proteínas semelhantes	37
4.1.4. Predição de epítomos de células B lineares	37
4.1.5. Predição de epítomos de células T	38
4.1.6. Predição de antigenicidade	39
4.1.7. Predição de características físico-químicas, estruturais e de patogenicidade	39
4.2. Construção do vetor	39
4.3. Transformação em células competentes	40
4.4. Isolamento dos plasmídeos recombinantes	40
4.5. Purificação de colônias	40
4.6. Expressão das proteínas recombinantes	41
4.7. Análise das proteínas	41
4.8. Purificação proteica	42
4.9. Quantificação de proteínas	42
4.10. <i>Western blotting</i>	42
4.11. Avaliação da antigenicidade	43
5. REFERENCIAS	45
CAPÍTULO 1	62
INTRODUÇÃO	65
MATERIAIS E MÉTODOS	66
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO	77
REFERENCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença complexa caracterizada como uma inflamação da glândula mamária, geralmente como consequência de agressões físicas, químicas, térmicas, mecânicas, ou ainda, e principalmente decorrentes de infecções microbianas (Bramley e Dodd, 1984; Philpot e Nickerson, 1991; Tozzetti et al., 2008). Esta doença pode ser dividida, de acordo à sua manifestação como formas clínicas, que aparece com sinais evidentes (edema, hipertemia, endurecimento e dor da glândula mamária), e subclínica, que não apresenta demonstrações evidentes no animal, mas se caracteriza por alterações na composição do leite (Santos e Fonseca, 2007; Ribeiro et al., 2016). As perdas na produção de leite em casos de mastite (seja subclínica ou clínica), chegam de 10 a 15% em alguns países, incluindo o Brasil (Manzi, 2014). *Mycoplasma bovis* é um patógeno frequente nestas infecções (Aebi et al. 2012, Nicholas et al. 2016, Al-Farha et al. 2017), responsável por surtos de alta disseminação, uma vez que tem facilidade de ser transmitido no rebanho (Jasper et al., 1974; Boothby et al. 1986; Sachse et al. 1993; Aebi et al., 2015; Piccinini et al., 2015; Haapalaa et al. 2018). No leite ordenhado de vacas com mastite causada por *M. bovis* é perceptível alterações como coloração mais escura e aparecimento de coágulos, além da queda na secreção láctea (Jasper, 1982; Pretto et al. 2001; Junqueira et al., 2017).

A pneumonia e artrite também são patologias associadas à presença de *M. bovis* e ambas podem ocorrer em qualquer idade do gado. A pneumonia, transcorre a partir da colonização deste patógeno no trato respiratório (Caswell et al., 2010; Slompo et al., 2017). As manifestações clínicas mais frequentes são a febre, taquipneia, dispneia, diminuição do apetite e, menos frequentemente, secreções nasais e tosse (Pfutzner e Sachse, 1996; Caswel e Archambault, 2007; Maunsell et al., 2011). A infecção do trato respiratório por *M. bovis* tem se tornado cada vez mais aparente nos últimos anos devido ao maior reconhecimento do papel do microrganismo na pneumonia em muitas partes do mundo (Nicholas et al., 2002; Calcutt et al., 2018) e devido à crescente resistência antimicrobiana (Ayling et al., 2000; Gautier- Bouchardon et al., 2014). A artrite, geralmente, acomete o animal em associação com outras infecções (Butler et al. 2000; Gagea et al. 2006; Maunsell et al., 2011). Os sinais mais evidenciados da infecção são comumente a artrite séptica, incluindo claudicação aguda com edema articular, dor e aumento da temperatura retal para 41°C, podendo ter febre e anorexia (Adegboye et al. 1996; Wilson et al. 2007; Calcutt et al., 2018).

A ocorrência e prevalência de *M. bovis* nos rebanhos, mostram-se conflitantes entre os estudos, quando avaliados em localidades distintas. Em amostras de mastite clínica bovina, Junqueira et al. (2017) detectaram ocorrência de 3% de *M. bovis* nas amostras, enquanto Manzi et al. 2018, relataram 1,4% para a espécie. Em estudos de prevalência, na França, Arcangioli e colaboradores em 2011, não obtiveram resultados significativos, com valor inferior à 1%. Entretanto, no Japão a prevalência de *M. bovis* foi a maior encontrada dentre as espécies de *Mollicutes*, com 59,7% (Higuchi et al., 2013). Al-Farha et al., 2017 na Austrália, em um estudo de prevalência num rebanho com 76,7% das amostras positivas para *Mycoplasma spp*, relatou que destes, 6,2% testaram positivo para *M. bovis*. No Brasil, são realizados poucos estudos acerca da prevalência de *M. bovis* e sua correlação com patologias bovinas (Salina, 2020). O primeiro caso observado de *M. bovis* na etiologia da mastite, foi relatado por Mettifogo et al. em Londrina-PR no ano de 1996. Em 2001, Pretto e colaboradores observaram no Paraná e São Paulo que 5,83% dos rebanhos infectados eram acometidos por *M. bovis*. No ano de 2014, Tamasso et al. Encontraram entre 4 à 20% de animais infectados pelo micoplasma no estado de Minas Gerais. Neste cenário, a ausência de dados atualizados é atribuída à dificuldade de detecção do patógeno frente à necessidade de métodos de alto custo e complexidade tanto para o isolamento quanto para a identificação do agente (Kampa et al. 2009; Manzi, 2014).

O desenvolvimento de métodos simples e rápidos de detecção facilitaria o diagnóstico. Detecção de *M. bovis* das amostras clínicas pelos métodos tradicionais de cultura é bastante demorado e muitas vezes dificultado pela contaminação bacteriana. Embora a tecnologia de detecção da biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR e qPCR), demonstre alta sensibilidade e especificidade, trata-se de uma técnica onerosa e dispendiosa para sua realização no diagnóstico clínico (Muthusamy et al.,2018), pois requerem laboratórios e equipamentos profissionais de diagnóstico. Tais instalações podem faltar na epidemia de doenças e em áreas pobres, especialmente nos países em desenvolvimento. O uso de métodos de diagnóstico no local seria útil no controle das infecções bovinas (Zhao et al., 2018).

A vacinação é considerada a prática preventiva mais efetiva no controle das doenças (Ross, 1999; Kathoon et al., 2017). Contudo, vacinas do tipo atenuada viva, bacteriana e proteicas, testadas contra *M. bovis*, até o momento demonstram-se ineficazes (Perez-casal, 2017). Bons alvos vacinais, as proteínas imunogênicas VspA, VspB e VspC de *M. bovis*, demonstraram-se ineficazes a longo prazo por suas variações antigênicas

altamente presentes nessas proteínas (Lysnyansky et al. 1999; Sachse et al. 2000). Vacinas bacterianas testadas em vitelos, demonstrou redução significativa nas lesões histopatológicas e diminuição das necroses pulmonares. Entretanto, posteriormente um número maior de animais vacinados em relação aos não vacinados, necessitou de antibioticoterapia (Urbanek et al. 2000; Nicholas et al. 2002). Vacinas atenuadas testadas em 2014 por Zhang et al., foram observadas, que em bovinos de 5 a 6 meses de idade houve pequena redução de *M. bovis* no grupo vacinado. Contudo, as respostas séricas de IgG às cepas atenuadas aumentaram, em contrapartida as respostas de IgA foram reduzindo até o fim do estudo (Feng et al. 2013; Zhang et al. 2014). Ademais, o modelo de produção destas vacinas convencionais demanda muito tempo, além de seu alto custo, tornando-se necessária a busca por métodos eficazes, rápidos e de baixo valor monetário (Chen et al. 2001; Kathoon et al., 2017).

Com o surgimento da imunoinformática, que inclui o estudo baseado em modelos matemáticos utilizando de algoritmos para mapear os possíveis epítomos de células B e T, diminui-se o tempo e custo requeridos em análises primárias do patógeno. Usando essa informação é possível explorar os potenciais locais de ligação, obtendo assim, maior precisão ao desenvolvimento de novas vacinas (Davies e Flower, 2007; Tomar e De, 2010; Donati e Rappuoli, 2013). A vacinologia reversa, com uso da grande quantidade de dados genômicos e proteômicos disponíveis, permite por meio da sua tradução, a obtenção de características proteicas pelas ferramentas de bioinformática (Ferreira e Porco, 2008; Dellagostin et al. 2017), avaliando prioritariamente as proteínas imunogênicas (Goodsween et al. 2014). Estas novas tecnologias tendem à substituição dos modelos tradicionais. Elimina-se a necessidade de que os agentes sejam inicialmente cultivados para seleção e modificados em suas características de virulência (Schatzmayr, 2003; Perez-casal, 2017). Assim, este estudo teve por objetivo, selecionar e analisar *in silico*, proteínas antigênicas que tenham potencial à produção de vacina e/ou diagnóstico contra *M. bovis*. Clonar, expressar, purificar e avaliar reatividade frente a soros sabidamente imunizados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Mollicutes*

Mollicutes são considerados procariotos de vida livre. Os microrganismos desta classe possuem todos uma membrana celular desprovida de parede celular (Brown et al., 2015), estão contidos em uma membrana trilaminar, por esse motivo não coram pelo método de Gram e apresentam morfologia pleomórfica. Essas bactérias são pequenos parasitas procariotos e estão entre os microrganismos auto replicantes com os menores genomas conhecidos (Halbedel et al., 2007). Considerados eubactérias, evoluíram de células gram-positivas *clostridium-like*, por deleção de genes, assim, esses microrganismos perderam a maioria de suas atividades biossintéticas, necessitando de hospedeiros para sua nutrição (Waites e Talkington, 2004).

A denominação *Mollicutes* é derivado de um adjetivo latim, *mollis* = macio, maleável, e de *cutis* = pele, indicando que os elementos da classe possuem um limite celular flexível ou maleável. Os microrganismos dessa classe são das mais pequenas bactérias conhecidas e o diâmetro das células podem variar entre 300-800 nm. Sua taxonomia pertencente ao Filo *Tenericutes*, inclui atualmente os gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma* e *Asteroleplasma*. Possui também um gênero de espécies não cultiváveis, o gênero “*Candidatus Phytoplasma*” (Brown et al., 2015). Estes se diferem por sua nutrição, características morfológicas e tamanho genômico (Blachard e Browning, 2014).

2.2 Gênero *Mycoplasma*

2.2.1 Características gerais do gênero *Mycoplasma*

Inicialmente micoplasma foi utilizado por Albert Bernhard Frank em 1889, para designar um protoplasma infectado por fungo em nódulos de plantas leguminosas (Krass e Gardner, 1973). A utilização do termo “micoplasma” foi comumente aplicado durante muitos anos a todos os elementos da classe *Mollicutes*, devido a ausência de parede celular desses microrganismos. No entanto, atualmente, este termo vem sendo utilizado de forma mais específica para espécies do gênero *Mycoplasma*. Quanto ao seu nome, a derivação vem dos nomes gregos *myces* = fungo, e *plasma* = algo formado ou moldado. (Brown et al., 2015)

As espécies do gênero possuem características como: requerimento de colesterol ou outros esteróis para o crescimento, temperatura ótima de crescimento a 37°C, incapacidade de realizar a hidrólise de ureia, genoma de dimensão variando entre 580 a 2.200 pb, além de serem comensais ou patógenos de hospedeiros vertebrados. (May et al., 2014; Brown et al., 2015).

Outras características relevantes das espécies de *Mycoplasma* são relacionadas a ausência de parede celular, como o polimorfismo das células que podem ser ovoides, esféricas, em forma de bastonete ou em forma de garrafa. Podem ainda, formar colônias filamentosas, com filamentos finos e ramificados. Colônias típicas podem apresentar protuberância central com a aparência de “ovo-frito”, ou apresentar-se com aspecto liso, com margens lisas, irregulares ou onduladas. Possuem capacidade de crescimento em meio sólido abaixo da superfície, resistência a lise por lisozima, suscetibilidade a lise por choque osmótico e outros agentes com capacidade de romper protoplastos bacterianos. Outra característica resultante da ausência de parede celular é a resistência a β -lactâmicos, polimixinas, vancomicina, fosfomicina, sulfonamidas e trimetoprima. (Brown et al., 2007; May et al., 2014)

Os micoplasmas podem ser classificados como aeróbios ou anaeróbios facultativos, havendo ainda, espécies que crescem bem em condições de anaerobiose. Em sua maioria, não possui motilidade, com exceção de algumas espécies que se movem por deslizamento (Brown et al., 2007). Nas espécies patogênicas os fatores de virulência estão associados com a invasão intracelular facultativa, formação de biofilmes e mobilidade. Ademais, possuem ainda antígenos de superfície variáveis (Vsp) que facilitam a evasão ao sistema imune dos hospedeiros (Brown et al., 2015).

Estudos comparativos do gene 16S rRNA, forneceu a relação filogenética de bactérias pertencentes à classe *Mollicutes*, com outras pertencentes a um subgrupo específico definido por bactérias do filo *Firmicutes*, isto é, microrganismos com baixos índices de guanina e citosina (Razin et al., 1998). Na base da filogenia dessa classe estão bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* (Woese et al., 1980; Shimkets e Woese, 1980; Johansson e Pettersson, 2002). *Mollicutes*, surge por evolução degenerativa de formas bacterianas mais complexas segundo estudos genéticos, bioquímicos e morfológicos. Perderam ainda, capacidade metabólica e sofreram redução a nível genômico (Woese et al., 1980).

As espécies do gênero *Mycoplasma* podem ser agrupadas em dois grandes grupos ramificados, de acordo com sua sequência genéticas. Assim, o grupo *hominis* possui os

ramos filogenéticos *equigenitalium*, *neurolyticum*, *hominis*, *synovia*, *lipophilum*, *pulmonis*, *sualvi* e *bovis*. O grupo *pneumoniae* contém os ramos filogenéticos *ureaplasma*, *pneumoniae*, *muris*, *fastidiosum* e um ramo de micoplasmas Hemotrópicos. No caso do grupo *spiroplasma* são encontrados mais alguns micoplasmas, estando também representado o ramo *Mycoplasma mycoides*. A presença de micoplasmas no grupo *spiroplasma* mostra que o gênero *Mycoplasma* não é um grupo monofilético (Weisburg et al., 1989; Johansson e Pettersson, 2002).

A taxonomia de *Mycoplasma* segue da seguinte maneira: Domínio *Bactéria*, filo *Tenericutes*, classe *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae*, gênero *Mycoplasma*. Segundo o *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, o gênero *Mycoplasma* possui 117 espécies e 4 subespécies com estatuto válido, 9 espécies *Candidatus*, 1 espécie *incertae sedis* e 4 espécies com estatuto inválido (Brown et al., 2015).

2.3 *Mycoplasma bovis*

2.3.1 Características gerais de *M. bovis*

Mycoplasma bovis foi isolado e identificado inicialmente em 1961, e assim, após surto de mastite bovina no estado do Connecticut dos Estados Unidos (Hale et al., 1962) foi reconhecido como agente causador de mastite bovina. Somente em 1976 foi incluído como um importante patógeno causador da doença respiratória bovina. A estirpe tipo é denominada Donetta, PG45, ATCC 25523 ou NCTC 10131 (Freundt, 1973; Caswell; Archambault, 2007). Inicialmente, *M. bovis* tinha a designação de *Mycoplasma agalactiae subsp. bovis* devido a características em culturas e sorológicas entre as espécies de *Mycoplasma agalactiae* e *Mycoplasma bovis* serem similares. Ainda em 1976, ascendeu a espécie, a partir de análise comparativa dos genomas das duas espécies, onde por hibridação DNA-DNA obteve homologia de 40 % (Askaa e Erno, 1976; Weisburg et al., 1989).

M. bovis são geralmente cocóides, embora possam apresentar-se de forma filamentosa. A formação de biofilmes, é responsável pela persistência no ambiente e no hospedeiro, além de auxiliar na cronicidade das doenças e resistência a antibióticos, por serem impermeáveis aos antibióticos e à ação dos macrófagos (Nicholas, 2011; Burki et al., 2016). As colônias em meio sólido apresentam a morfologia de “ovo-frito” com centros grandes, e produzem “filmes e manchas”, indicando a presença de atividade

lipolítica. A temperatura ótima de crescimento é de 37 °C, podendo ser utilizada uma atmosfera de 5 % de CO₂ e agitação. Esta espécie é capaz de oxidar piruvato ou lactato para a produção de energia sob a forma de ATP, mas não é capaz de fermentar glicose nem de hidrolisar arginina (Brown et al., 2015).

M. bovis é um membro da classe *Mollicutes*, um grupo de bactérias sem parede. Compreende um grupo diversificado que possui os menores genomas de organismos auto-replicantes (Lopes et al., 2018). *M. bovis* é um importante patógeno de bovinos e bisões que está associado a uma gama relativamente ampla de manifestações da doença. O tratamento da infecção por *M. bovis* com antimicrobianos é muitas vezes improdutivo, exigindo diagnóstico precoce e liberação de drogas para eficácia (Ayling et al., 2000; Barberio et al., 2016).

2.4 Patogenicidade de *M. bovis*

A espécie bovina *Bos taurus* são reservatórios naturais de *Mycoplasma bovis*, que é considerado causador de mastite bovina e artrite (Maeda et al., 2003; Houlihan et al., 2007). Além disso, em menores frequências estão associados à ceratoconjuntivite, otite média supurativa, meningite, abscesso, distúrbios genitais: metrite, aborto, vesiculite seminal e infertilidade (Maeda et al., 2003; Kanda et al., 2019). Ademais, *M. bovis* associado a outras bactérias e vírus, ainda é considerado um dos agentes etiológicos do complexo de doença respiratória bovina (BRDC), mais precisamente pneumonia e broncopneumonia (Pfutzner e Sachse, 1996; Taylor et al., 2010).

Embora amplamente discutido como patógeno bovino, *M. bovis* parece estar em uma gama mais alargada de hospedeiros, há relatos de que foram isolados em animais como bisão americano, porcos, aves, cabra e até mesmo no homem (Subramaniam et al., 1998). Contudo, a exceção do bisão americano, a mortalidade nas demais espécies quando acometidos por doenças causadas pelo micoplasma são mais baixas que no gado bovino. Entretanto, deve-se atentar a estes hospedeiros, pois podem funcionar como vetores de transmissão do microrganismo (Pfutzner e Sachse, 1996).

Infecções por *M. bovis* não são zoonóticas, embora afete bovinos em todas as suas faixas etárias. Além disso, possui importância econômica, visto que as patologias trazem impactos significativos em todos os setores de gado - leiteiro, cárneo e de criação – com redução da produção de leite, diminuição do ganho de peso e morte (Pfutzner e Sachse, 1996; Nicholas e Ayling, 2008; Maunsell et al., 2011). A eliminação de *M. bovis* é

dificultada quando este se estabelece no hospedeiro (Pfutzner e Sachse, 1996; Maunsell et al., 2011), pois há facilidade na propagação podendo ser vertical ou horizontal. A transmissão vertical ocorre de uma vaca infectada com *M. bovis* para o feto, ainda pode acontecer pela da via mamária, colostro e/ou leite contaminados (Horwood et al., 2014). Quando se trata da transmissão horizontal, esta pode ocorrer de forma direta ou indireta de um hospedeiro portador para outros animais. O microrganismo pode ser transmitido por via direta, quando há o contato entre aerossóis e ou nariz, e ainda trato genital ou sêmen. De forma indireta, pode ocorrer por meio de água, ambientes contaminados e alimentos, principalmente quando compartilhados entre o rebanho (Nicholas e Ayling, 2003; Maunsell et al., 2011). Vitelos podem ser considerados como vetor de transmissão, uma vez que os mesmos podem estar infectados com o microplasma sem apresentar sinais ou manifestações clínicas. Podendo provocar infecções em gerações futuras, assim em portadores assintomáticos a manipulação desses animais é uma importante forma de disseminar o microrganismo (Pfutzner e Sachse, 1996; Caswell e Archambault, 2007).

As patologias mais preocupantes associadas a *M. bovis* são as doenças que atingem o trato respiratório, pois são as responsáveis por causar mais mortes no gado. Contudo, do ponto de vista econômico a mastite traz grandes prejuízos, haja vista as perdas tanto na quantidade ordenhada do leite, quanto na qualidade do produto (Caswell et al, 2010). Em se tratado de prevalência, mastites e pneumonias afetam mais animais adultos, enquanto gado jovens e vitelos, são mais acometidos pela broncopneumonia e a artrite (Jasper, 1987; Horwood et al., 2014).

2.4.1 Mastite bovina por *M. bovis*

A bovinocultura brasileira tem grande importância no cenário mundial, quando se trata da produção leiteira, destaque na produção econômica do país, bem como na geração de emprego (Embrapa, 2022). Desse modo, algumas patologias trazem grandes preocupações para os produtores, a exemplo da mastite bovina, que podem gerar perdas da produção e gastos onerosos. A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, podendo o animal ser acometido por vias de origem fisiológica e/ou metabólica, traumas e infecções. Embora seja uma doença de caráter multifatorial por envolver diversos patógenos, bem como o ambiente e os cuidados com o gado, estima-se que 90% seja causadas por origem bacteriana, principalmente, a mastite contagiosa. (Lopes et al., 2018; Oliveira et al., 2016; Coser et al., 2012; Neto et al., 2011). Esta doença pode ser

dividida, de acordo a sua manifestação em forma clínica e subclínica (Santos e Fonseca, 2007; Ribeiro et al., 2016).

A etiologia da mastite bovina, é representada por vários agentes contagiosos, a nível mundial os principais são: *Mycoplasma bovis*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Lagoni et al., 1998; Jayarao et al., 2004). Espécies do gênero micoplasma, estão mundialmente distribuídas, e assim, presentes como patógenos causadores de doenças bovinas, a exemplo da mastite em vacas lactantes (Quinn et al., 2005). Embora, mastite ocasionada por microrganismos do gênero sejam relativamente comuns em rebanhos leiteiros, no Brasil este patógeno ainda é subestimado (Nicholas e Ayling., 2003; Quinn et al., 2005). Apesar de várias espécies de micoplasma terem sido isoladas em casos de surtos de mastite bovina. A mastite por *M. bovis* passou a ser considerada como uma importante doença emergente do gado recentemente, isso pelo aumento da sua prevalência em rebanhos bovinos em vários países e as perdas econômicas significativas nas fazendas leiteiras (Gelgie et al., 2022). Atualmente, *M. bovis* é considerado o patógeno da mastite de maior importância, principalmente por acarretar uma maior patogenicidade, serem considerados como altamente contagiosos e causadores de maior incidência de infecções em rebanhos (Bushnell, 1984; Quinn et al., 2005).

Quando causada por *M. bovis*, a mastite apresenta sinais clínicos incluindo o aumento de casos que não respondem ao tratamento. Além disso, apresentam agalaxia podendo afetar mais de um quarto mamário. Uma das maiores dificuldades encontradas é a possibilidade de o animal apresentar-se saudável, ainda que esteja contaminado com mastite grave (Pretto et al., 2001). Alguns sinais clínicos menos comuns podem ainda serem observados, como a claudicação, associação a poliartrite, edemas apresentados em membros anteriores e emagrecimento (Wilson et al., 2007). Um animal positivo para mastite causada por *M. bovis*, pode ser o responsável pela disseminação e desencadeamento de episódios de infecções, mesmo em lotes que estejam livres do patógeno (Punyapornwithaya et al., 2011). Ademais, a introdução do agente em rebanhos livres, se dá pelo comércio e aquisição de novilhas e bezerros que clinicamente podem apresentar-se saudáveis, sendo portadores sadios de *M. bovis*. Assim, a maior dificuldade encontrada é que uma vez introduzido o patógeno no rebanho, torna-se difícil a sua erradicação (Gourlay et al., 1989).

Ainda, quando ocasionada por *M. bovis*, responde mal aos tratamentos sejam eles sistêmico ou intramamário. Vacas com mastite clínica causada pelo micoplasma muitas

vezes é resistente à antibioticoterapia. Mesmo após se curarem espontaneamente ou terem seus testes negativados, muitas vezes permanecem com ocorrências esporádicas na forma subclínica da doença, assim devem ser consideradas infectadas continuamente (Maunsell et al., 2011).

2.4.2 Papel do *M. bovis* no Complexo de Doença Respiratória Bovina

O complexo de doença respiratória bovina possui papel importante devido às altas taxas de morbidade no rebanho. Além disso, configura-se como um dos principais fatores que influenciam a redução da produtividade dos rebanhos bovinos leiteiros, sobretudo os de manejo intenso em sistema de confinamento (Snowder et al., 2006). A maioria das vezes em que o animal é acometido por doenças respiratórias bovinas (BRD) são em resposta ao desequilíbrio entre o sistema imune do animal e os desafios de manejo/ambientais, aos quais os bovinos estão submetidos. Alteração abrupta da dieta, condições climáticas desfavoráveis, estresse pela superlotação, animais com diferenças na idade e perfis imunológicos no mesmo loteamento, o transporte ou mudança de ambientes são alguns desses fatores, (Svensson e Liberg, 2006).

A doença respiratória bovina é considerada então, uma síndrome multifatorial e multietiológica e, são responsáveis por causar grandes prejuízos econômicos à agropecuária devido os elevados índices de morbidade dos animais quando acometidos pela doença. Acredita-se que a baixa resposta à tratamentos, sejam responsáveis pelo aumento da letalidade em vacas lactantes acometidas pela BRD. Outro fator que influencia o processo é a falta de diagnóstico precoce e a presença de casos crônicos que dificultam o estabelecimento de cura desses animais (Snowder et al., 2006; Panciera e Confer, 2010).

M. bovis é responsável pelo acometimento do gado ocasionando muitas doenças e sinais clínicos, incluindo a broncopneumonia. Ainda, o microrganismo é relatado como agente etiológico em BRD, responsável por perdas econômicas consideráveis (Nicholas e Ayling, 2003; Dudek e Bednarek, 2012). O quadro clínico de doenças respiratórias causadas por *M. bovis*, comumente não é característico e não difere de outras sintomatologias causadas por infecções por outros microrganismos, principalmente em casos de coinfeções (Ridley e Hateley, 2018).

A pneumonia relacionada ao *M. bovis* pode acometer animais de qualquer faixa etária, afetando bovinos de corte, bem como de produção leiteira, sobretudo após a

chegada ao confinamento. As sintomatologias clínicas são específicas e incluem redução do apetite e assim, diminuição no ganho de peso, febre, taquipneia, dispneia, podendo apresentar corrimento nasal (Stipkovits et al., 2011). Os animais acometidos pela pneumonia crônica por *M. bovis* podem ainda, apresentar concomitantemente casos de artrite, otite média, ou ambos (Caswell e Archambault, 1996).

M. bovis pode ser isolado a partir de tecidos pulmonares de bovinos, mesmo que esses se apresentem sem lesões. Assim, a sua presença em pulmões com pneumonia precisa de interpretação associada com a histopatologia e outros achados clínicos (Maunsell et al., 2011). O pulmão afetado pode ser observado macroscopicamente, contendo vários focos de necrose com material caseoso amarelo em seu interior. A pneumonia por *M. bovis* pode ser determinada como subaguda e até mesmo denominada como broncopneumonia crônica que geralmente é necrosante (Caswell e Archambault, 1996).

2.4.3 Doenças bovinas menos frequentes relacionadas ao *M. bovis*

Animais de qualquer idade podem apresentar artrite relacionada ao *M. bovis*. Os casos possuem menor frequência e em sua maioria estão relacionados com outras infecções como a mastite e/ou pneumonia, embora exista relatos de surtos de artrite por *M. bovis* sendo esta infecção predominante em bezerros e vacas leiteiras (Stipkovits et al., 2011). As indicações são típicas de artrite séptica: inchaço das articulações, claudicação aguda, dor à palpação, aumento da temperatura retal para 41°C, podendo ainda apresentarem febre e anorexia (Adegboye et al., 1996; Calcutt et al., 2018).

A otite média em sua forma branda, os animais permanecem com bom apetite e em alerta. Entretanto, com a evolução do quadro, o gado pode apresentar-se febril e com sinais de anorexia. Os sinais clínicos para a infecção são dores de ouvido percebido pelo balanço excessivo da cabeça e a infecção do nervo craniano com a existência de pruridos intensos. Otite média por *M. bovis* pode acometer bezerras leiteiras de forma esporádica ou ainda em surtos no rebanho em animais confinados. *M. bovis* pode ainda causar ceratite uni ou bilateral, rompimento do tímpano, causando descarga purulenta (Francoz et al., 2004; Lamm et al., 2004).

Existem outras doenças bovinas que são menos frequentes relacionadas ao *M. bovis*, assim os estudos relacionando o microrganismo e essas patologias são escassos. Muitas dessas infecções são raramente encontradas quando há a presença do microrganismo.

Abcessos por decúbito, aparecem sobre os tetos e articulações, mas foram encontrados e relatados em apenas 50 bezerros (Kinde et al., 1993). Para doenças cardíacas, são relatadas a presença de *M. bovis* em 4 bezerros de um total de 92 que morreram por miocardite (Haines et al., 2004). Outras patologias bovinas podem estar associadas a outras doenças, a meningite pode se relacionar com os sinais clínicos da artrite grave e complicações da otite. A ceratoconjutivite e os distúrbios reprodutivos, embora tenha isolado *M. bovis* nessas infecções, não se tem estudos que corroboram para confirmar que se tenha um papel importante nessas doenças (Pfutzner e Sachse, 1996).

2.5 Diagnóstico de *M. bovis*

M. bovis não causam sintomas e lesões específicas do agente em animais infectados, dessa forma o diagnóstico laboratorial é imprescindível para a caracterização na etiologia da doença (Thomas et al., 2002). O diagnóstico pode ser realizado com o animal *ante mortem* ou *post mortem*. Com o animal ainda vivo, as amostras mais comuns são as de swab nasal e nasofaríngeo e os lavados broncoalveolar e transtraqueal. Ademais, em animais *post mortem* as amostras normalmente são de gânglios e tecidos pulmonares, embora, amostras da mama, baço, peritônio, rim e fígado também sejam utilizadas para análises (Doyle et al., 2017).

Na rotina clínica o diagnóstico padrão ouro na detecção de micoplasmas é o isolamento em cultura. Entretanto, a utilização de sangue para a detecção de anticorpos e a identificação molecular podem ser realizados pelo método sorológico ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e/ou PCR (do inglês polymerase chain reaction). O método escolhido é determinado pelo tipo de amostra a ser analisado (Sibila et al., 2008; Dudek et al., 2020).

2.5.1 Cultivo

O diagnóstico de infecções por micoplasmas é dificultado no isolamento do agente por uma série de exigências destes microrganismos no crescimento de cada espécie. Embora existam meios distintos para a detecção e o isolamento de micoplasmas, um fator limitante é que esses microrganismos apresentam crescimento lento no meio de cultura podendo levar até 10 dias em média. As bactérias desse gênero são fastidiosas, com isso, nos primeiros dias de incubação pode ocorrer contaminação das culturas pelo crescimento de outros microrganismos menos exigentes. Dessa maneira, pode ser impossibilitado a

identificação das espécies de micoplasmas das amostras, aumentando ainda a possibilidade de resultados falsos-negativos (Freundt, 1983; Clothier et al., 2010).

Ademais, o cultivo microbiológico não favorece a diferenciação das espécies, dessa forma, são necessários testes complementares para a identificação das mesmas. Deve-se ser considerado principalmente pelo fato de haver coinfeção com mais espécies de micoplasmas. Assim, a implementação de um método diagnóstico que seja capaz de detectar de forma mais rápida e eficiente as espécies tornam-se importantes (Clothier et al., 2010; Al-Farha et al., 2017). Contudo, o método de cultivo além de padrão ouro, fornece as suas vantagens, relacionadas a alta especificidade e sensibilidade, além de possibilitar a identificação de vários micoplasmas e isso inclui novas espécies em uma mesma amostra. O isolamento bacteriano possui importância devido a obtenção de microrganismos viáveis, propiciando a definição de genótipos e fenótipos dos isolados (Sachse et al., 1993; Caswell et al., 2010; Nicholas, 2011).

Testes bioquímicos são utilizados como complementos na identificação dos microrganismos em cultura. Entretanto, é imprescindível uma cultura pura em fase logarítmica de crescimento. Frequentemente, os testes bioquímicos usados são: Hidrólise da arginina, redução do tetrazólio, fermentação da glicose e produção de “Film and Spots”. Para as espécies de *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma agalactiae* testes fenotípicos são inviáveis, vez que as espécies possuem muitas semelhanças, assim a diferenciação destas só podem ser confirmadas após testes moleculares, sendo a PCR geralmente utilizado por se tratar de um método mais seguro (Sachse et al., 1993; Brown et al., 2007).

2.5.2 Método sorológico

Métodos sorológicos para identificação de *M. bovis*, como: hemaglutinação indireta e imunoblotting (Nicholas et al., 2009; Rifatbegovic et al., 2009) são descritos na literatura como possíveis testes ao diagnóstico do microrganismo em infecções bovinas. Contudo, trata-se de testes de execução mais complexa, dessa forma, acabam sendo menos difundido. O método de ELISA se sobressai a estes, por se tratar de um diagnóstico específico, sensível e rápido, além de não necessitar muita manipulação da amostra evitando contaminação e/ou perda das mesmas. Além de poderem ser aplicadas quando se tem quantidade elevada de amostras (Nicholas et al., 2016; Doyle et al., 2017).

A detecção do patógeno pode ser feita quando ocorre a soroconversão, dessa forma, não é possível que sejam detectados durante o período de incubação. Assim, a detecção de anticorpos (Sandwich ELISA) pode ser feita entre 10 e 14 dias após a infecção, sendo possível a utilização de soros tanto do leite, quanto de sangue, sendo essa também uma desvantagem do método. O ELISA indireto, ou conhecido como ELISA de captura de antígeno, possui desvantagem, pois neste pode ocorrer reação cruzada entre antígenos de *M. agalactiae* e *M. bovis*. Entretanto, possui vantagem de ser aplicado em outras amostras que não somente o soro do animal. Assim, o método ELISA amplia a sua utilidade para a triagem de animais suspeitos a nível de exploração, favorecendo o comércio de importações e exportações (Sachse et al., 1993; Nicholas, 2011; Nicholas et al., 2016).

Detectar anticorpos contra *M. bovis* em soro de bovinos, é uma das formas mais confiáveis de diagnosticar uma infecção causada pelo patógeno, pois os níveis de anticorpos no soro permanecem altos durante vários meses, podendo ser assim detectados nos testes pelo método de ELISA (Gevaert, 2006). Esse método torna-se importante principalmente, em casos de investigação, ou quando os animais estão em uso de antibiótico por longos períodos, o que dificulta o isolamento do agente, ademais, ainda podendo ser vantajosos em casos de infecções crônicas, vez que o isolamento é dificultado (Nicholas, 1997). Animais que apresentam *M. bovis* em suas vias aéreas anteriores, raramente há a soroconversão, assim, a presença de anticorpos específicos indica infecção no animal (Nicholas & Ayling, 2003).

2.5.3 Métodos moleculares

Os métodos de detecção do patógeno partindo da biologia molecular (DNA e RNA) ganha espaços consideráveis na identificação de *M. bovis* em amostras bovinas. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), demonstram serem sensíveis e altamente específicas nos estudos de diagnóstico. Entretanto, trata-se de técnicas onerosas e dispendiosas para o diagnóstico clínico, tanto em materiais utilizados, quanto em mão de obra especializadas (Muthusamy et al., 2018; Zhao et al., 2018). A qPCR é uma ferramenta molecular que tem expandido a sua utilização nos campos de pesquisa. Embora o seu processo seja similar ao de uma PCR convencional, esta permite a identificação e quantificação do DNA do patógeno quando ainda é amplificado, otimizando o processo, com o uso de compostos fluorescentes que emitem sinais no momento da amplificação do DNA durante os ciclos (Oliveira, 2010).

A detecção de *M. bovis* em rebanhos bovinos utilizando a qPCR permite que haja o processamento de várias amostras em poucas horas. Além disso, a técnica possibilita especificidade aumentada com a utilização de sondas com sequencias específicas de genes alvos relativos ao patógeno. Sequencias que são altamente conservadas em *M. bovis*, dessa forma permitem que o DNA seja quantificado até mesmo em baixas concentrações na amostra (Clothier et al., 2010; Sachse et al., 2010). A qPCR é bastante utilizada em pesquisas desse agente utilizando amostras de leite (Cai et al., 2005; Rosseti et al., 2010; Sachse et al., 2010), o teste fornece resultados satisfatórios quanto a identificação dos microrganismos, com alta sensibilidade de detecção (Behera et al., 2018).

A PCR quando comparado ao método diagnóstico de cultura, não avalia a viabilidade do microrganismo, vez que sua análise é feita sob a presença de ácidos nucleicos. Por se tratar de uma bactéria fastidiosa torna o processo de cultura custoso, assim, a PCR obtém vantagem por permitir que *M. bovis* seja detectado diretamente nas amostras biológicas, de forma rápida, facilitando o controle em animais principalmente em estados crônicos ou subclínicos da doença. Além de possuir grande sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, rapidez na obtenção de resultados e capacidade de análise de muitas amostras em simultâneo (Sachse et al., 1993; González et al., 1995).

Por PCR é também possível a confirmação da identificação de um isolado como *M. bovis*, assim, o método molecular tem tido um papel fundamental no diagnóstico laboratorial do microrganismo. Na PCR pode-se analisar qualquer amostra biológica o que facilita o processo de diagnóstico. Contudo, é necessário alguns cuidados na preparação das amostras para análise, afim de diminuir a possibilidade de resultados falsos negativos ou falsos positivos. Todo o processo de preparação das amostras requer cuidados, pois as fontes de contaminação estão em todo o processo: Pipetas, reagentes, superfícies, luvas, podem ser origens de contaminação e ocasionar resultados falsos positivos. A divisão entre os espaços de preparação de mix e adição do DNA, incluir controles (positivos e negativos) na reação, garantem maior segurança aos resultados, bem como favorece a validação do mesmo (Hoorfar et al., 2004).

Uma das maiores dificuldades do diagnóstico de *M. bovis*, é a sua semelhança com o *M. agalactiae*, com isso há PCR convencionais que minimizam esse processo. *M. bovis* possui como alvo o gene 16S rRNA e este se diferencia em oito posições de nucleotídeos com o de *M. agalactiae*, com isso os primers utilizados nessa reação são desenhados com base nestas diferenças. O isolamento de *M. agalactiae* em bovinos é raro e, por este

motivo, o primer Mbo-PCR implementado pode ser aplicado ao diagnóstico de *M. bovis* (González et al., 1995).

2.6 Tratamento, controle e prevenção

O tratamento de bovinos acometidos pelo *M. bovis*, é bastante limitado, as mastites causadas pelo agente apresentam em sua maioria quadros crônicos da doença, além de não serem responsivas ao tratamento. Antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos a exemplo das penicilinas, cefalosporinas possuem modo de ação contra a parede celular, dessa forma, não possuem eficácia contra *M. bovis*. Ademais, em estudos realizados *in vitro*, tem-se percebido uma crescente resistência na Europa para alguns macrolídeos e tetraciclina. Ainda, alguns isolados do agente têm demonstrado resistência à maioria dos antimicrobianos disponíveis e recomendados para o tratamento contra o *M. bovis* em bovinos (Ayling et al., 2014; Sulyok et al., 2014; Szacawa et al., 2014). O agente, além de demonstrar diminuição em sua suscetibilidade as fluoroquinolonas, estas tem apresentado insegurança em sua recomendação para uso, principalmente em animais de consumo humano (Ayling et al., 2000; Froyman e Perzo, 2005; Klein et al., 2019).

Devido a predisposição para o crescimento da resistência antimicrobiana em isolados de *M. bovis*. Torna-se importante estabelecer métodos consistentes e efetivos na erradicação das infecções pelo patógeno. Impedir a disseminação do microrganismo em rebanhos não é fácil por se tratar de uma bactéria altamente contagiosa e de fácil transmissão, com isso, em rebanhos saudáveis optar por rastreios utilizando testes sorológicos, podem garantir maior eficiência em manter este rebanho livre do microrganismo. Esse tipo de rastreio está em vigor na Irlanda, e por mais que não se possa afirmar que o rebanho nacional esteja livre de *M. bovis*, o controle está sendo efetivo na diminuição dos casos (O'Farrell et al., 2001; Lysnyansky et al., 2017).

A Nova Zelândia, um dos últimos países a detectar *M. bovis* em seus rebanhos, assume um plano de controle e erradicação mais drásticos, vez que no país a decisão é por abater bovinos acometidos pelo patógeno. Além da notificação por parte das fazendas quando estiverem com rebanhos infectados, de acordo com o Grupo Consultivo Técnico em 2019, essa medida ainda que seja desafiadora, no país tem sido viável devido ao alto número de fazendas infectadas rastreadas posteriormente. A detecção nas fazendas infectadas tem sido facilitada com o uso dos diagnósticos moleculares e sorológicos em concomitância (Dudek et al., 2020). Assim, os protocolos de controle de *M. bovis*, deveriam inserir monitoramento regular, com avaliação dos tanques de leite e triagem

longitudinal de animais jovens em rebanhos, diminuindo assim a possibilidade de infecções como mastite e pneumonia (Vahanillila et al., 2019).

A sanitização é uma outra forma de potencializar a prevenção de infecções por *M. bovis*. Embora não sejam comuns estudos sendo realizados com a ação de desinfetantes na inativação de *M. bovis*, uma higienização eficaz em fazendas de rebanhos bovinos, limpeza e manutenção dos equipamentos utilizados na ordenha, higienização correta da mão de obra, como a lavagem e assepsia das mãos entre a ordenha dos animais tendem a diminuir a proliferação e disseminação do patógeno (Rodrigues, 2019). Estudos mais recentes observaram que a utilização de hipoclorito de sódio e ácido cítrico quando na presença de material orgânico (1% e 0,5%, respectivamente) e na ausência de material orgânico (0,04% e 0,25%, respectivamente) apresentou uma redução na viabilidade de *M. bovis* (Mahdizadeh et al., 2020). Ademais, pesquisas relacionadas a higienização pré e pós ordenha, além da imersão dos tetos dos animais em soluções antisséptica demonstram atividade germicida contra o microrganismo, sendo a utilização de iodo um dos mais eficientes para utilização (Boddie et al., 2002).

Com as dificuldades encontradas na erradicação do agente e à crescente resistência aos antimicrobianos por parte de algumas cepas de *M. bovis*, a forma de tentar frear a disseminação do patógeno seria a prevenção, sendo a vacinação uma das estratégias mais eficazes no controle de doenças atualmente (Dudek et al., 2019; Klein et al., 2019). Entretanto, mesmo com o aumento das pesquisas que demonstrem interesse no controle das doenças bovinas, o agente ainda é problemático devido à falta de uma vacina comercial eficaz. *M. bovis*, possui cepas que apresentam variações antigênicas de superfície, dessa forma, conseguem evadir do sistema imunológico do hospedeiro, assim, potencializa-se as dificuldades em desenvolver uma vacina que confira proteção aos rebanhos bovinos contra as variantes existentes (Mettifogo e Tamaso, 2013).

Ademais, mesmo com o aumento dos estudos realizados usando vacinas experimentais, poucos países possuem vacinas comerciais, a exemplo dos Estados Unidos, que possui vacinas baseadas em bacterinas que tem sido utilizadas na prevenção de doenças respiratórias em novilhas. Entretanto, a eficácia dessas vacinas em uso não é totalmente satisfatória, principalmente por não possuir dados suficientes para avaliar a imunogenicidade e proteção que confere ao hospedeiro (Soehnlen et al., 2012; Nicholas et al., 2016). Alguns outros países restringem-se a utilização até o momento de vacinas autógenas, mas buscando o desenvolvimento de uma vacina comercial que consiga

ampliar o controle das infecções causadas por *M. bovis* (Nicholas et al., 2002; Klein et al., 2017). O Brasil até o momento não apresenta vacina comercial contra o patógeno.

Em 2002, Nicholas e colaboradores observaram em estudos experimentais eficácia da vacinação contra a progressão de pneumonia em novilhas. Após o desafio com *M. bovis*, avaliaram que houve diminuição dos sinais clínicos, bem como da disseminação do patógeno para outros órgãos internos. Contudo, em vacas acometidas pela mastite, o controle é feito pela segregação ou descarte dos animais infectados, afastando a possibilidade de disseminação da doença para animais que estejam saudáveis (Nicholas et al., 2016). Assim, a vacinação dos animais possibilita reduzir os casos de mastite por *M. bovis*, à medida que a resposta imune destes aumenta (Boothby et al., 1988).

As vacinas do tipo inativadas, são comumente as mais utilizadas em estudos experimentais na proteção de infecções causadas por *M. bovis*. Contudo, esse tipo de vacina possui desvantagens por se tratar de uma metodologia onerosa e dispendiosa. Além disso, possui facilidade de mutações das proteínas nas cepas utilizadas durante a cultura. Entretanto, essas desvantagens tendem a serem minimizadas com os estudos recentes utilizando a análise proteômica, vez que estas demonstram não terem alterações nas principais proteínas de membranas e antígenos, após os estudos *in vitro*. Além disso, os custos de produção de tais vacinas inativadas possuem uma redução significativa (Wang et al., 2020).

Estudos com vacina bacterina, avaliando a proteção contra o patógeno após desafio intratraqueal com cepas de *M. bovis* em bezerros, demonstra redução significativa da doença clínica de doenças respiratórias. Além disso, observou estímulo eficaz na produção de anticorpos anti-*M. bovis*, permanecendo em níveis superiores aos controles até o fim do estudo. A vacina ainda foi eficaz no estímulo da imunidade de mucosas nos bezerros vacinados (Dudek et al., 2016). Outra vacina bacterina testada contra uma cepa heteróloga de *M. bovis*, obteve resultados semelhantes aos de Dudek e colaboradores, (2016) obtendo resposta humoral em bezerros duas semanas após a vacinação e produção de anticorpos que permaneceram até o final do estudo. Contudo, a vacina não foi reproduzida comercialmente (Nicholas et al., 2002).

Vacinas de subunidades também foram testadas, com base em antígenos de *M. bovis* como extrato de células inteiras, proteínas recombinantes e frações de membrana do microrganismo. Foi observado resposta humoral elevada aos antígenos, entretanto, apesar de estimular a expressão de citocinas IL-17 e a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), não houve proteção dos bezerros contra

infecções ocasionadas por *M. bovis* e contra a sua colonização pulmonar (Prysliaik e Perez-Casal, 2016; Prysliaik et al., 2018). Um outro modelo de vacina de subunidade testada, envolveu a combinação de extratos e gliceraldeído-3-fosfato de *M. bovis*. Entretanto, não foi observado respostas mediadas por células de memória. Mesmo com resposta humoral observada pelas respostas séricas, não houve proteção contra o desafio e as respostas celulares também não foram suficientes. Em alguns casos houve o aumento da doença, com base em sinais clínicos pulmonares, representativos de infecções por *M. bovis* (Prysliaik et al., 2013).

Estudos com cepas de *M. bovis* isolada na China, foram realizados com a produção de vacina atenuada viva visando a prevenção de casos de pneumonia relacionada ao micoplasma. Houve redução dos sinais clínicos observados em bezerros imunizados, sendo a proteção contra a perda de peso mais evidente. Contudo, foram isolados *M. bovis* na mesma proporção entre vacinados e não vacinados. Além disso, a resposta humoral foi percebida após 7 dias da vacinação, com duração curta em pouco mais de um mês. A vacina não protegeu o hospedeiro contra a disseminação do patógeno, além de não estimular a imunidade de mucosas (Zhang et al., 2014).

Vacina recombinante utilizando um modelo de coinfeção BHV-1/*M. bovis* visando a proteção contra a pneumonia crônica e a síndrome da poliartrite também foi testada em bovinos confinados. Embora o estudo tenha demonstrado boas respostas de Th1/Th2 à alguns antígenos de *M. bovis*, não foi observado redução das lesões pulmonares específicas do microrganismo comparando ao controle, mesmo com a vacinação houve um aumento significativo na disseminação de *M. bovis* nos hospedeiros e parece ter estimulado a doença o que ocasionou mortes em bovinos após serem desafiados (Prysliaik e Perez-Casal, 2016; Prysliaik et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar e selecionar proteínas antigênicas que sejam potenciais à produção de vacinas ou diagnóstico para *Mycoplasma bovis*.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar proteínas de membrana e extracelulares presentes no proteoma de *M. bovis*.
- Selecionar, dentre as proteínas de membrana e extracelulares, as proteínas imunodominantes.
- Caracterizar com base nos parâmetros de antigenicidade, alergenicidade e características físico-químicas os melhores alvos potenciais à vacinação contra *M. bovis*.
- Clonar e purificar proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* como sistema heterólogo.
- Avaliar a reatividade de proteínas recombinante.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises de Bioinformática

4.1.1 Obtenção dos proteomas

Os proteomas das cepas de *M. bovis* foram obtidos usando o Universal Protein Resource - UniProt (www.uniprot.org/). As cepas utilizadas no presente estudo foram *M. bovis* CQ-W70 (ID UP000027182) e *M. bovis* (ID UP000233776), sendo essas duas classificadas como não redundantes.

4.1.2 Predição de localização subcelular e estrutura secundária

Com o intuito de obter proteínas transmembrânicas e extracelulares, as sequências proteicas selecionadas foram submetidas à predição de localização subcelular no web-software PSORTb versão 3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>), utilizando as configurações sugeridas para *Mycoplasma* spp, sendo assim, considerado gram negativo sem membrana extracelular. A fim de identificar topologia de membrana combinado à previsão de peptídeo sinal, foi utilizado o servidor TOPCons (<http://topcons.cbr.su.se>). Proteínas preditas como membranares pelo PSORTb com quantidade inferior ou igual à quatro regiões transmembrânicas de acordo à previsão pelo TOPCons e proteínas preditas como extracelulares pelo PSORTb com previsão de peptídeo sinal pelo TOPCons, foram selecionadas para procedência do estudo.

4.1.3 Agrupamento de proteínas semelhantes

Com a finalidade de excluir as sequências diferentes entre os dois proteomas de interesse, foi realizada uma análise de agrupamento entre as proteínas selecionadas nas análises anteriores usando o web-software CD-HIT Suite (http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi). As sequências que apresentaram um nível de identidade maior que 80% foram escolhidas para continuidade da pesquisa.

4.1.4 Predição de Epítomos de células B lineares

A predição de epítomos de células B foi feita em programa público online Immune Epitope Database – IEDB (<http://www.iedb.org/>), no qual foi realizado um consenso entre a ferramenta Bepipred e os modelos baseados nos parâmetros de hidrofobicidade (Parker; Guo; Hodges, 1986), flexibilidade (Karplus; Schulz, 1985), acessibilidade (Emeni et al, 1985) e regiões de beta-turn (Chou; Fasman, 1978). Para todas as ferramentas foi utilizada uma janela de sete aminoácidos e um ponto de corte de 0,8 para o Bepipred e 1,0 para os demais.

4.1.5 Predição de epítomos de células T

As proteínas que apresentaram epítomos de células B consensuais à todas as ferramentas do IEDB, seguiram para predição de epítomos de células T. As proteínas de membrana foram analisadas pelo web-server NetMHCIIpan 3.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>), utilizando uma janela de 15 aminoácidos e ponto de corte padrão. As proteínas extracelulares foram analisadas utilizando NetMHCcons 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCcons/>), configurado para uma janela de 9 aminoácidos e ponto de corte padrão. Os alelos utilizados para as predições de epítomos de MHC classes I e II foram obtidos de acordo às informações inseridas no Immuno Polymorphism Data-base (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>) para o BoLA, onde os cinco alelos bovinos mais prevalentes de cada um dos cinco genes (BoLA-1, BoLA-2, BoLA-3, BoLA-6 e BoLA-NC1) MHCI e os genes (DRB3, DQA e DQB) para MHCII foram selecionados e utilizados para predição. A sequência fasta dos alelos foi utilizada para predição pelo NetMHC II, no qual, estas foram submetidas uma por vez para DRB3, enquanto, para DQA e DQB foram realizados uma combinação de forma que todos os alelos fossem arranjados entre os genes (figura 1). Para o ponto de corte, foi calculado o percentil da afinidade de ligação dada pelo web server, em que ligações com percentil menor que 0,5 foram consideradas de ligação forte e entre 0,5 e 2,0, foram consideradas ligações fracas.

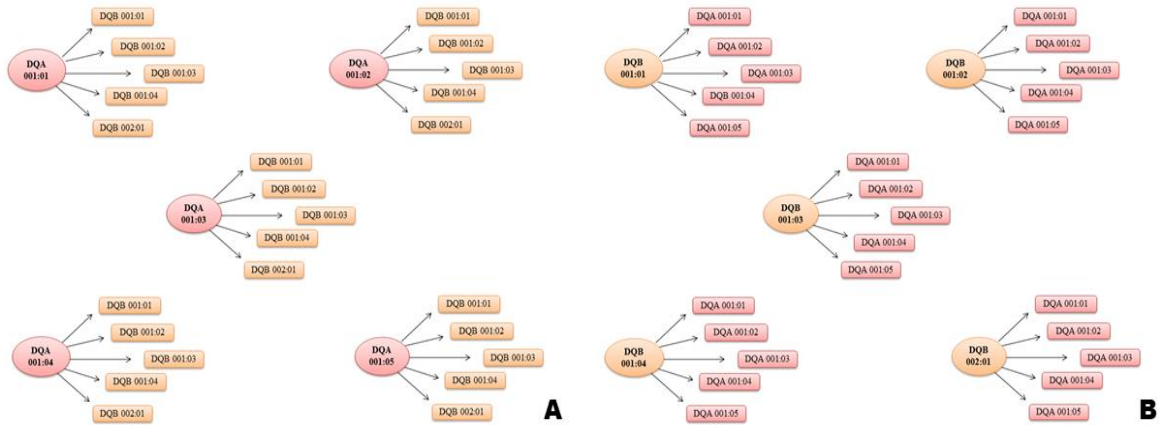


Figura 1. Proteínas previstas como proteína de membrana, submetidas ao NETMHC II afim de prever as ligações dos peptídeos ao MHC de classe dois. Em A os alelos foram combinados ao gene DQA como parâmetro e em B, a combinação foi realizada com o gene DQB.

4.1.6 Predição de antigenicidade

Após as predições de epítomos células T, as proteínas que apresentaram maior promiscuidade passaram pela predição de antigenicidade pelo programa VaxiJen 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), com configuração de treshold de 0.4, sendo utilizado como último filtro para a seleção dos alvos.

4.1.7 Predição de características físico-químicas, estruturais e de patogenicidade

A fim de conhecer a patogenicidade das proteínas selecionadas, foi utilizado o programa público online denominado MP3 (<http://metagenomics.iiserb.ac.in/mp3/index.php>), utilizando treshold padrão. As características físico-químicas dos alvos, como, ponto isoelétrico teórico, índice de estabilidade, índice de solubilidade, tempo de meia vida in vivo e ex vivo e peso molecular foram previstas pelo servidor público online ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). A predição de estrutura secundária foi feita a partir do JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/>). Por fim foi utilizado o programa I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para predição da estrutura tridimensional das proteínas alvos.

4.3 Construção do vetor

As sequências preditas por bioinformática, foram destinadas à construção do plasmídeo pela empresa GeneScript. A sequência de interesse foi inserida no vetor de expressão pET-28a(+), foi ainda utilizado as enzimas de restrição NdeI/XhoI, os códons foram otimizados para códons preferenciais de *E. coli*, o plasmídeo foi construído com uma cauda de poli histidina e sítio de resistência à canamicina.

4.4 Transformação em células competentes

A transformação de células competentes foi realizada em One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, incluídas no kit de expressão Champion™ pET Directional TOPO ® (Invitrogen). Adicionados delicadamente 3 µL da reação de clonagem às células em transformação e incubados em gelo durante 30 minutos. Em seguida, a reação foi submetida ao choque térmico em 42°C, durante 30 segundos, sem agitação e, subseqüentemente, acondicionadas em gelo. Em seguida, 250 µL de meio S.O.C foram adicionados e a solução agitada a 37°C, sob 200 RPM, durante 1 hora. Posteriormente, 100-200 µL de cada transformação foi plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) contendo 100 µg/mL de canamicina e incubado a 37°C, overnight.

4.5 Isolamento dos plasmídeos recombinantes

A partir da transformação de células, deram-se as escolhas das colônias para serem cultivadas *overnight* em meio LB contendo canamicina. Posteriormente, foi realizado o isolamento dos plasmídeos a partir da utilização do kit PureLink™ HQ Mini Plasmid Purification.

4.6 Purificação de colônia

Após o isolamento dos plasmídeos recombinantes, a colônia correta foi isolada e inoculada em 5 mL de LB contendo canamicina. Quando o crescimento atingiu a fase estacionária 900 µl da cultura pura foi adicionado à 100 µL de glicerol estéril e armazenado, sob refrigeração, à -80°C.

4.7 Expressão das proteínas recombinantes

Para a realização da expressão proteica, foram utilizadas as cepas de *E. coli* Arctic, pLysS, C41, C43, Tunner e BL21, após otimização a cepa C43 (DE3) seguiu sendo a cepa de expressão utilizada. Inicialmente, para realização de transformação das células de expressão, foi adicionado 10 ng de DNA plasmideal em 5 mL de células *E. coli* C41 (DE3), homogeneizados delicadamente e acondicionados em gelo por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi submetida a choque térmico durante 30 segundos, a 42°C, sem agitação e acondicionada imediatamente em gelo por 2 minutos. 250mL de meio S.O.C, a temperatura ambiente, foram adicionados e incubado a 37°C, durante 30 minutos sob agitação de 200 RPM. Subsequentemente, foram adicionados 10mL de LB contendo 100 µg/mL de canamicina e 1% de glicose. O meio foi mantido overnight, à 37°C, sob agitação.

A expressão proteica foi iniciada a partir da adição de 10 ml do meio LB contendo 100 µg/mL de canamicina, à 100 µL das células de *E. coli* transformadas e então mantidos em incubação *overnight* a 37°C, sob agitação de 180 a 200 RPM. Posteriormente, o pré-inóculo foi então inoculado em 1 litro de meio LB e submetido a 37°C e agitação, durante 3 horas, verificando a densidade óptica em espectrofotômetro a 600nm até atingir absorvância entre 0,6 e 0,8. Em seguida, foi retirada alíquotas da cultura marcando assim o tempo zero (T0), logo após, a indução foi então realizada com a adição de 1mM de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida), assim, a cultura foi novamente incubada sob agitação a 37°C *overnight*, da cultura induzida, foram feitas novamente alíquotas, marcando o tempo overnight, e juntamente com o T0 foram centrifugadas (10 minutos, 4°C, 5000 RPM), em sequência foram levadas a uma corrida em gel SDS, para observar o rendimento da expressão.

O restante da cultura foi centrifugado (30 minutos, 4°C, 5000 RPM) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 200mL de tampão RIPA, acondicionado em gelo por 30 minutos, nesse período a amostra foi levada ao vórtex por 3 vezes, em seguida, foi centrifugada (40 minutos, 4°C, 5000 RPM), do lisado foi então coletado o sobrenadante e filtrado em membrana de 0,22 µm.

4.8 Análise das proteínas

Cada sedimento celular foi ressuspensionado em 50 µL (1:1) de tampão de amostra de SDS-PAGE 1X, fervido por 5 minutos. 10µL de cada amostra foram aplicadas em gel

de poliacrilamida (Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8; SDS 10%; acrilamida/bisacrilamida 30%/0.8%; persulfato de amônio 10%; TEMED), corrido em tampão (Tris 25 mM; glicina 250mM; SDS 0,1%). No gel foi aplicado 5 µL de padrão de peso molecular. Após a corrida, as proteínas foram fixadas com ácido acético 10% e metanol 40% a 25°C e corado com Coomassie Blue. A cultura não induzida por IPTG, foi utilizada como controle negativo.

4.9 Purificação proteica

O lisado filtrado foi dividido em alíquotas para a purificação, em cada alíquota foi acrescido imidazol a 10mM e assim, realizado a purificação por cromatografia de afinidade em coluna contendo resina quelante de níquel (HisTrap™ HP, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, EUA). Para a purificação foram feitas diferentes concentrações de imidazol diluído em tampão Tris NaCl (10mM, 20mM, 30mM, 50mM, 100mM, 200mM, 1M). As frações foram coletadas, separadas alíquotas para análise do grau de pureza das proteínas feita em corrida de SDS-PAGE e confirmadas em Western blot. Ainda, para a concentração das proteínas dessa purificação, foi realizada centrifugação em 3.000 RPM, em tubos Vivaspin MWCO 10kDa para concentração e troca de tampão, onde foi substituído o imidazol por tampão 0,1M TRIS, 0,5M NaCl, 10% de glicerol, pH 8,5.

4.10 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford utilizando como curva padrão, a partir da concentração de 5mg/mL, diluição seriada de soro albumina bovina (BSA). Como branco foi utilizado o tampão Tris NaCl na ausência da proteína. Em uma microplaca, foram adicionados 10µL da amostra teste ou padrão no poços em duplicatas com 350µL do reagente de Bradford. Em seguida, a leitura da placa foi realizada a 595nm e os dados foram submetidos a análise no excel para a determinação da concentração.

4.11 Western blot

As proteínas foram analisadas por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. Num sistema descontínuo, composto de um gel de empilhamento constituído por 4% de

acrilamida - bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 10% SDS, 0,05% de persulfato de amônia, 0,05% de Temed e contendo Tris-HCl 0,5 M, pH 6.8. Esse gel foi pipetado sobre um gel de corrida constituído por 12% de acrilamida -bisacrilamida (29,2% / 0,8%), 10% SDS, 0,05% persulfato de amônia, 0,05% de Temed e Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8. A eletroforese foi realizada em tampão de migração contendo Tris 0,124 M, glicina 0,96 M, 0,5% de SDS, pH 8.3, durante 3 horas, numa corrente de 30mA. As proteínas presentes foram visualizadas no gel corado com comassie blue. As proteínas separadas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose (Millipore), em tampão de transferência contendo Tris 0,25 M, glicina 0,193 M e 20% de metanol. Após a transferência, a membrana foi corada com uma solução aquosa de vermelho Ponceau S, descorada em água destilada, cortada em tiras de aproximadamente 3mm e bloqueados com leite desnatado a 5% em salina fosfato, contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T 20), por 12 horas, a 4°C. Logo após, foram realizadas três lavagens da membrana em PBS-T e incubadas com o Anti-His (1:2000) diluído em PBS-T contendo 1% de leite desnatado, durante 1:30 horas, em seguida, foram realizadas novamente três lavagens da membrana em PBS-T, e incubadas com o anticorpo secundário Anti-Mouse (1:10000) diluídos em PBS-T acrescidos de 1% de leite desnatado durante o período de 1:30 horas, por fim foram realizadas novamente três lavagens da membrana e adicionado à solução reveladora DAB + Peroxido de Hidrogênio (1:10).

4.12 Avaliação da antigenicidade

Para avaliar a antigenicidade, foram testados soros de coelhos sabidamente imunizado com *M. bovis* utilizando *Dot blotting*. Os soros foram adquiridos da soroteca, em parceria com o laboratório de micoplasma da USP, foram utilizados três soros Rabbit M129 anti sera. Para isso membranas de nitrocelulose foram marcadas com círculos para evitar o extravasamento da proteína quando adicionada na membrana. O experimento foi organizado em: branco, onde na membrana foram adicionados 10 µL do tampão Tris NaCl em duplicata, controle negativo e Soro 1, Soro 2, Soro 3, foram adicionados 10 µL (5,38 µg) da proteína também em duplicata. Após a secagem completa das membranas foram levadas a tubos de ensaio contendo tampão fosfato (PBS) + leite desnatado 5%, mantidos *overnight* a 4°C. Em sequência, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minuto com PBS-T. Após isso, foram incubadas por 2 horas sob agitação de 80 RPM, a 37°C. Nesse momento, com exceção do controle negativo que foi adicionado

apenas PBS-T contendo Leite desnatado 1%. Em todas as demais amostras foram adicionados soros de coelho infectado diluído na solução 1:200. Em seguida, novamente foram lavadas por cinco minutos, três vezes, e então incubados por 2 horas PBS-T contendo leite desnatado 1% acrescidos de Anti IgG de coelho diluído (1:1000) em todos os tubos. Logo após, as membranas foram lavadas novamente seguindo esquema supracitado, estendidas em placa de petri, e adicionados a solução reveladora DAB + peróxido de Hidrogênio (1:10). Após aguardar 3 minutos para revelação, a reação foi parada com o uso de água destilada.

5 REFERENCIAS

ADEGBOYE, D.S, RASBERRY, U, HALBUR, P.G, ANDREWS, J.J & ROSENBUSCH, R.F. (1995). Monoclonal antibody-based immunohistochemical technique for the detection of *Mycoplasma bovis* in formalin-fixed, paraffin embedded calf lung tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigations**, 7, 261-265.

ADEGBOYE D.S, HALBUR P.G, NUTSCH R.G, et al. *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and arthritis complicated with pyogranulomatous tenosynovitis in calves. **J Am Vet Med Assoc** 1996; 209:647–649.

AEBI M, BODMER M, FREY J. & PILO P. 2012. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. **Vet. Microbiol.** 157(3):363-368

AEBI, M, VAN DEN BORNE, B.H.P, RAEMY, A, STEINER, A, PILO, P, BODMER, M. 2015. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. **Acta Vet. Scand.** 57, 10.

ALBERTI, A. M. F, ADDIS, B. CHESSA, T. CUBEDDU, M. PROFITI, S. ROSATI, A. RUIU, AND M. PITTAU. 2006. Molecular and antigenic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. **J. Vet. Diagn. Invest.** 18:41–51.

AL-FARHA A.A.-B., HEMMATZADEH F., KHAZANDI M., HOARE A. & PETROVSKI K. 2017. Evaluation of effects of *Mycoplasma mastitis* on milk composition in dairy cattle from South Australia. **BMC Vet. Res.** 13(1):351

ALTUN S. ÖZDEMİR S. Detection of *Mycoplasma bovis* Infection in Cattle Mammary Tissue by Immunofluorescence and qRT-PCR Methods. **Kocatepe Vet J.** (2019) 12(2):110-115.

ARCANGIOLI M.A., CHAZEL M., SELLAL E., BOTREL M.A., BEZILLE P., POUMARAT F., CALAVAS D. & LE GRAND D. 2011. Prevalence of *Mycoplasma bovis* udder infection in dairy cattle: preliminary field investigation in southeast France. **N. Z. Vet. J.** 59(2):75-78

- ASKAA, G., & ERNO, H. (1976). NOTE: Elevation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to Species Rank: *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 26(3), 323-325.
- AYLING, R. D. et al. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. **The Veterinary record**, v. 146, n. 26, p. 745–747, jun. 2000.
- AYLING, R.D., BAKER, S.E., PEEK, M.L., SIMON, A.J. & NICHOLAS, R.A.J. (2000). Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis* strains in Northern Ireland. **Vet Rec**, 146, 745-747.
- AYLING RD, ROSALES RS, BARDEN G, GOSNEY FL. Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain. **Vet Rec**. 2014;**175**:486. doi: 10.1136/vr.102303.
- BALL, H.J. & FINDLAY, D. (1998). Diagnostic applications of monoclonal antibody-based sandwich ELISAs. In: Miles, R.J., Nicholas, R.A.J. (Eds.), **Mycoplasma Protocols. Humana Press**, Totowa, USA, pp. 127–132.
- BARBERIO, A.; FLAMINIO, B.; DE VliegHER, S.; SUPRÉ, K.; KROMKER, V.; GARBARINO, C.; ARRIGONI, N.; ZANARDI, Z.; BERTOCCHI, L.; GOBBO, F.; CATANIA, S.; MORONI, P. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates identified in milk from dairy cattle in Belgium, Germany, and Italy. **J Dairy Sci.**, v.99, n.8, p.6578-6584, 2016.
- BICKNELL, S.R.; JACKSON, G.; BOUGHTON, E.; WILSON, C.D.; *Mycoplasma bovis* mastitis in the dry cow. **Vet Rec**, p.102-389, 1978.
- BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. Mastitis: causas, epidemiología y control. Zaragoza: Acríbia, 1999. 39 p.
- BOCKLISCH H., PFÜTZNER H. & ZEPEZAUER V. (1989). - Natürliche und experimentelle Infektionen von Schaflämmern mit *Mycoplasma ovipneumoniae*. Arch. exp. **Vet Med.**, 43, 755-761.
- BOCKLISCH H., KREUSEL S., BRYNS A. & PFÜTZNER H. (1991). – Experimental infection of the udder of ewes due to *Mycoplasma bovis*. **J. vet. Med.**, B, 38, 385-390.
- CASWELL, J. L., AND M. ARCHAMBAULT. 2007. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. **Anim. Health Res. Rev.** 8:161–186.
- BODDIE R.L., OWENS W.E., RAY C.H., NICKERSON S.C., BODDIE N.T. Germicidal activities of representatives of five different teat dip classes against three

bovine mycoplasma species using a modified excised teat model. *J. Dairy Sci.* 2002;85:1909–1912.

BOOTHBY J.T., MUELLER R., JASPER D.E. & THOMAS C.B. 1986. Detecting *Mycoplasma bovis* in milk by enzyme-linked immunosorbent assay, using monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.* 47:1082-1084.

BOOTHBY, J. T.; SCHORE, C. E.; JASPER, D. E.; OSBURN, B. I.; THOMAS, C. B. Immune responses to *Mycoplasma bovis* vaccination and experimental infection in the bovine mammary gland. *Can J Vet Res.*, v.52, n.3, p.355, 1988.

BOROVSKY Z, et. al. (1998). *Mycoplasma penetrans* invasion of HeLa cells induces protein kinase C activation and vacuolation in the host cells. *J. Med. Microbiol.* 47: 915-922.

BRAMLEY, A.J. AND DODD, F.H., 1984. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis Control - progress and prospects. *J. Dairy Res.*, 51: 481-512.

BROWN, D. R., WHITCOMB, R. F., & BRADBURY, J. M. (2007). Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(11), 2703-2719.

BROWN, D. R.; BRADBURY. J. M. The Contentious Taxonomy of Mollicutes. In: BLANCHARD ALAIN; BROWNING GLENN. *Mycoplasmas: MOLECULAR BIOLOGY PATHOGENICITY AND STRATEGIES FOR CONTROL*. NORFOLK: **Caister Academic Press**, p. 1-14, 2014.

BROWN, D. R., MAY, M., BRADBURY, J. M. AND JOHANSSON, K.-E. 2015. Mollicutes. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**.

BROWN, D. R., MAY, M., BRADBURY, J. M., BALISH, M. F., CALCUTT, M. J., GLASS, J. I., TASKER, S., MESSICK, J. B., JOHANSSON, K.-E. AND NEIMARK, H. 2015. *Mycoplasma*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 1–71.

BRUSIC V, PETROVSKY N. 2005 Immunoinformatics and its relevance to understanding human immune disease. *Expert Ver. Clin Immunol.* 1, 145-157.

BURKI, S., FREY, J., AND PILO, P. (2015). Virulence, Persistence and Dissemination of *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol.* 179, 15-22.

BURKI, S., SPERGSEER, J., BODMER, M., & PILO, P. (2016). A dominant lineage of *Mycoplasma bovis* is associated with an increased number of severe mastitis cases in cattle. *Veterinary microbiology*, 196, 63-66.

BURVENICH, C.; MERRIS, V. van; MEHRZAD, J.; DIEZ-FRAILE, A.; DUCHATEAU, L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. **Veterinary Research, Les Ulis**, v. 34, p. 521-564, 2003.

BUSHNELL RB. Mycoplasma mastitis. Symposium on mastitis. **Vet Clin North Am Large Anim Pract**. 1984;6:301-12.

BUTLER JA, SICKLES SA, JOHANNIS CJ, ROSENBUSCH RF. Pasteurization of discard mycoplasma mastitic milk used to feed calves: Thermal effects on various mycoplasma. **J Dairy Sci** 2000;83: 2285–2288.

CALCUTT MJ, LYSNYANSKY I, SACHSE K, FOX LK, NICHOLAS RAJ, AYLING RD. Gap analysis of *Mycoplasma bovis* disease, diagnosis and control: an aid to identify future development requirements. **Transbound Emerg Dis**. 2018;65(Suppl 1):91–109.

CASWELL, J. L., AND M. ARCHAMBAULT. 2007. Mycoplasma bovis pneumonia in cattle. **Anim. Health Res. Rev.** 8:161–186

CASWELL, J. L.; ARCHAMBAULT, M. Mycoplasma bovis pneumonia in cattle. **Anim Health Res Rev**, v. 8, n. 2, p. 161–186, 1996.

CASWELL, J. L., AND M. ARCHAMBAULT. 2007. Mycoplasma bovis pneumonia in cattle. **Anim. Health Res. Rev.** 8:161–186

CASWELL JL, BATEMAN KG, CAI HY, CASTILLO-ALCALA F. Mycoplasma bovis in respiratory disease of feedlot cattle. **Vet Clin North Am Food Anim Pract** 2010;26:365-79.

CHEN, J. R.; LIAO, C. W.; MAO, S. J.; WENG, C. N. A recombinant chimera composed of repeat region RR1 of Mycoplasma hyopneumoniae adhesin with Pseudomonas exotoxin: in vivo evolution of specific IgG response in mice and pigs. **Veterinary Microbiology**. 80, 347-357, 2001.

CITTI C, BLANCHARD A. 2013. Micoplasmas e seu anfitrião: Patógenos mínimos emergentes e reemergentes. **Tendências em Microbiologia**, 21196-203.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. Mastite bovina : Controle e Prevenção. [S.l: s.n.], 2012. Disponível em: < bt-93-Mastite-prevencao-1.pdf (professormarcosarelio.com.br)>. Acesso em: 15 de Novembro 2022.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 1, n. 1, p. 3- 9, 1998.

COSTA, E.O.; SANTOS, F.G.B.; MÁRMORE, C.; ARCARO, J.R.P.; PERES, A.A.C.; RAIÁ, R. B. Influência da intensidade da mastite subclínica por microrganismo do

Gênero *Staphylococcus*, estimada por escores de CMT e CCS, na composição do leite: gordura, proteína e lactose. **Revista Nappama**, São Paulo, v.9, p13-18, 2006.

CRUZ, R. S.; ALEXANDRINO, E.; MISSIO, R. L.; RESTLE, J.; MELO, J. C.; PAULA NETO, J. J.; NEIVA, J. N. M.; MENDES FILHO, G. O.; SOUZA JÚNIOR, A.; DUARTE, T. D.; REZENDE, J. M.; SILVA, A. A. M. Desempenho bioeconômico de tourinhos alimentados com níveis de concentrado e farelo do mesocarpo de babaçu. **Semana: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 2159-2174, 2014.

DAVIES MN, FLOWER DR. Harnessing bioinformatics to discover new vaccine. **Drug Discov Today** 2007; 12:389–95.

DELLAGOSTIN, O.A., GRASSMANN, A.A., RIZZI, C., SCHUCH, R.A., JORGE, S., OLIVEIRA, T.L., MCBRIDE, A.J.A., HARTWIG, D.D. Vaccinologia Reversa: Uma Abordagem para a Identificação de Candidatos a Vacinas Leptospirais. **Int. J. Mol. Sci.** 2017, 18, 158.

DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. **Acta Veterinária Brasília**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2007.

DONATI C, RAPPUOLI R (2013) [Reverse vaccinology in the 21st century: improvements over the original design](#). **Ann N Y Acad Sci** 1285: 115-132

DOYLE, D., CREDILLE, B., LEHENBAUER, T. W., BERGHAUS, R., ALY, S. S., CHAMPAGNE, J., WOOLUMS, A. (2017). Agreement Among 4 Sampling Methods to Identify Respiratory Pathogens in Dairy Calves with Acute Bovine Respiratory Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**.

DUDEK K, BEDNAREK D. Último levantamento da prevalência de *Mycoplasma bovis* em bovinos polidos acometidos com síndrome respiratória. **Touro Vet Inst Pulawy**. 2012; 56:447–451.

DUDEK K., BEDNAREK D., AYLING R.D., KYCKO A., SZACAWA E., KARPIŃSKA T.A. An experimental vaccine composed of two adjuvants gives protection against *Mycoplasma bovis* in calves. **Vaccine**. 2016 ;34:3051–3058.

DUDEK K., BEDNAREK D., AYLING R.D., KYCKO A., REICHERT M. Estudo preliminar sobre os efeitos da enrofloxacin, flunixin meglumina e pegbovigrastim na pneumonia por *Mycoplasma bovis*. **BMC Vet**. 2019; 15:371.

DUDEK K, NICHOLAS RAJ, SZACAWA E, BEDNAREK D. *Mycoplasma bovis* Infections-Occurrence, Diagnosis and Control. **Pathogens**. 2020 Aug 6;9(8):640.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA **Anuário do leite** 2019. Disponível em:

<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>>. Acesso em 9 de abril de 2020.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA **Anuário do leite** 2022. Disponível em: < [ANUÁRIO Leite 2022: pecuária leiteira de precisão. - Portal Embrapa](#)>. Acesso em 11 de Novembro 2022.

EUZEBY (J.P.): List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1997, 47, 590-592.
FENG ZX, WEI YN, LI GL, LU XM, WAN XF, PHARR GT, et al. Development and validation of na attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol vaccine. **Vet Microbiol** 2013;167:417-24.

FERREIRA J, PORCO A. Vacunas derivadas del análisis de los genomas: vacinología inversa. **INCI**. 2008;33:353-358.

FOX LK, KIRK JH, BRITTEN A. Mycoplasma mastites: a review of transmission and control. **J Vet Med B Infect Dis Vet Pub Health** 2005;52:153-60.

FOX, L. K. 2012. Mycoplasma mastitis. Causes, transmission, and control. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 28:225–237.

FRANCOZ, D.; FECTEAU, G.; DESROCHERS, A.; FORTIN, M. Otitis media in dairy calves: a retrospective study of 15 cases (1987 to 2002). **The Canadian Veterinary Journal**. 29 v. 45, n. 8, p. 661–6, 2004.

FREUNDT, E. (1973). Type strains of species of the order Mycoplasmatales, including designation of neotypes for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, *Mycoplasma agalactiae* subsp. *agalactiae*, and *Mycoplasma arthritis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 23(1), 55-61.

FREUNDT, E. A. (1983). Culture media for classic mycoplasmas. *Methods in mycoplasmaology*, 1, 127-135.

FROYMAN, R. & PERZO, J.F. (2005). Antimicrobial sensitivity of field strains of *Mycoplasma bovis* recently isolated from beef cattle in France. **Bayer Animal Health: France, study** 2005-074.

GAGEA MI, BATEMAN KG, SHANAHAN RA, et al. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and polyarthritis in feedlot beef calves. **J Vet Diagn Invest** 2006;18:29–40.

GAUTIER-BOUCHARDON, A.V., FERRE´, S., LE GRAND, D., PAOLI, A., GAY, E., POUMARAT, F., 2014. Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. **PLOS ONE** 9.

GELGIE A.E., KORSA M.G., KERRO DEGO O. *Mycoplasma bovis* Mastitis. **Curr Res Microb Sci.** 2022 Feb 24;3:100123.

GEVAERT, D. (2006). The importance of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease. *Tijdschr Diergeneeskd*, 131, 124-126.

GOFF, J.P. Overview of metabolic disease: Impact of energy protein and mineral issues on health and immunity of the periparturient cow. In: Proceedings of the congress of the world association for buiatrics, v. 29, 2016.

GONZÁLEZ, Y. R. C., BASCUÑANA, C. R., BÖLSKE, G., MATTSSON, J. G., MOLINA, C. F., & JOHANSSON, K. E. (1995). In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Veterinary microbiology**, 47(1-2), 183-190.

GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. **Vet. Clin. Food Animals**, v. 19, p. 199-221, 2003.

GOODSWEEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. Discovering a vaccine against neosporosis using computers: is it feasible? **Trends in Parasitology**, v. 30, p. 401-411, 2014.

HAAPALAA V, POHJANVIRTAB T, VÄHÄNIKKILÄB N, HALKILAHTIC J, SIMONEND H, PELKONENB S, SOVERIA T, SIMOJOKIA H, AUTIOB T. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. **Veterinary Microbiology**, 2018; 216: 60–66.

HAINES, D. M.; MOLINE, K. M.; SARGENT, R. A. Immunohistochemical study of *Hemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia hemolytica* and bovine viral diarrhea virus in death losses due to myocarditis in feedlot cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 3, p. 231–234, 2004.

HALBEDEL, SVEN; HAMES, CLAUDINE; STULKE, JORG. Regulation of Carbon Metabolism in the Mollicutes and Its Relation to Virulence. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**. 2007.

HALE, H. H., HELMBOLDT, C. F., PLASTRIDGE, W. N., & STULA, E. F. (1962). Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. **The Cornell veterinarian**, 52, 582-591.

HAZELTON, M.S., MORTON, J.M., PARKER. A.M., SHEEHY, P.A., BOSWAR, K.L., MALMO, J., CASA, J.K. Whole dairy herd sampling to detect subclinical intramammary *Mycoplasma bovis* infection after clinical mastitis outbreaks. **Veterinary Microbiology**. V. 244. 2017

HIGUCHI H., GONDAIRA S., IWANO H., HIROSE K., NAKAJIMA K., KAWAI K., HAGIWARA K., TAMURA Y. & NAGAHATA H. 2013. Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. **Vet. Rec.** 172(21):557.

HOORFAR, J., WOLFFS, P., & RÅDSTRÖM, P. (2004). Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. **Apmis**, 112(11-12), 808-814.

HORWOOD, P. F., SCHIBROWSKI, M. L., FOWLER, E. V., GIBSON, J. S., BARNES, T. S., & MAHONY, T. J. (2014). Is Mycoplasma bovis a missing component of the bovine respiratory disease complex in Australia? **Australian veterinary journal**, 92(6), 185-191.

HOULIHAN, M.G.; VEENSTRA, B.; CHRISTIAN, M.K.; NICHOLAS, R.; AYLING, R. Mastitis and arthritis in two dairy herds caused by Mycoplasma bovis. **Vet. Rec.** 2007, 160, 126–127.

JASPER, D.E., AL-AUBAIDI, J.M., FABRICANT, J., 1974. Epidemiologic observations on Mycoplasma mastitis. **Cornell Vet.** 64, 407–415.

JASPER D.E. 1982. The role of Mycoplasma in bovine mastitis. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 181:158-162.

JASPER D.E.1987. Bovine mastitis due to Mycoplasma. **Vet. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** 6: 801-807.

JAYARAO BM, PILLAI SR, SAWANT AA, WOLFGANG DR, HEGDE NV. Guidelines for monitoring bulk tank somatic cell and bacterial counts. **J Dairy Sci.** 2004;87:3561-73.

JOHANSSON, K. E., & PETTERSSON, B. (2002). Taxonomy of Mollicutes. In **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas** (pp. 1-29). Springer US.

JUNGI TW, KRAMPE M, SILEGHEM M, GRIOT C, NICOLET J. Differential and strainspecific triggering of bovine alveolar macrophage effector functions by mycoplasmas. **Microb Pathog** 1996;21:487-98.

JUNQUEIRA N.B., OLIVEIRA G.C., SALINA A., GUIMARAES F.F., JOAQUIM S.F., LATOSINSKI G.S. & LANGONI H. 2017. Mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in Brazil. Proceedings of the XVIII International Congress of the International Society for Animal Hygiene “International Cooperation and Solidarity in Animal Hygiene towards One Health”, Mazatlan, Mexico, p.195 197.

KAMPA, J.; SUKOLAPONG, V.; BUTTASRT, A.; CHAROENCHAI, A. Prevalence of Mycoplasma bovis and other contagious bovine mastitis pathogens in bulk tank Milk of

dairy cattle herds in Khon Kaen Province, Thailand. **Thai J.Vet. Med.**, v. 39, n. 3, p. 275-280, 2009.

KANDA, T.; TANAKA, S.; SUWANRUENGSRRI, M.; SUKMAWINATA, E.; UEMURA, R.; YAMAGUCHI, R.; SUEYOSHI, M. Bovine Endocarditis Associated with *Mycoplasma bovis*. **J. Comp. Pathol.** 2019, 171, 53–58.

KHAN, F. A. et al. Immunoproteomic identification of MbovP579, a promising diagnostic biomarker for serological detection of *Mycoplasma bovis* infection. *Oncotarget*, jun. 2016.

KHATOON, N., PANDEY, R.K. & PRAJAPATI, V.K. Exploring *Leishmania* secretory proteins to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine using immunoinformatics approach. **Sci Rep** 7, 8285 (2017).

KINDE, H.; DAFT, B. M.; WALKER, R. L.; CHARLTON, B. R.; PETTY, R. *Mycoplasma bovis* associated with decubital abscesses in Holstein calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, n. 2, p. 194–197, 1993.

KLEIN U, DE JONG A, MOYAERT H, EL GARCH F, LEON R, RICHARD-MAZET A, ROSE M, MAES D, PRIDMORE A, THOMSON JR, AYLING RD. Antimicrobial susceptibility monitoring of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma bovis* isolated in Europe. **Vet Microbiol.** 2017;**204**:188–193.

KLEIN U., DE JONG A., YOUALA M., EL GARCH F., STEVENIN C., MOYAERT H., ROSE M., CATANIA S., GYURANECZ M., PRIDMORE A. New antimicrobial susceptibility data from monitoring of *Mycoplasma bovis* isolated in Europe. **Vet. Microbiol.** 2019;238:108432.

KRASS, C. J., & GARDNER, M. W. (1973). Etymology of the term *Mycoplasma*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 23(1), 62-64.

LANGONI H, SILVA AV, CABRAL KG, DOMINGUES PF, SILVA AV. Aspectos etiológicos na mastite bovina. **Rev BrasMed Vet.** 1998;20:204-10.

LAMM, C. G.; MUNSON, L.; THURMOND, M. C.; BARR, B. C.; GEORGE, L. W. *Mycoplasma* otitis in California calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 5, p. 397–402, 2004.

LOPES, B. C., MANZI, M. P., LANGONI, H. Etiologia das mastites: pesquisa de microorganismos da classe Mollicutes. **Vet. e Zootec.**, v. 25, n.2, 2018.

LYSNYANSKY I, SACHSE K, ROSENBUSCH R, LEVISOHN S, YOGEV D. The vsp locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features. **J Bacteriology** 1999; 181:5734-41.

LYSNYANSKY, I. AND AYLING, R. (2016). *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility. **Frontiers in Microbiology**, 7.

LYSNYANSKY I, FREED M, ROSALES RS, MIKULA I, KHATEB N, GERCHMAN I, et al. Na overview of *Mycoplasma bovis* mastites in Israel (2004-20014). **Vet J** 2016;207:180-3.

LYSNYANSKY I., MIKULA I., OZERI R., BELLAICHE M., NICHOLAS R.A.J., VAN STRATEN M. *Mycoplasma bovis* Seroprevalence in Israeli Dairy Herds, Feedlots and Imported Cattle. **Isr. J. Vet. Med.** 2017;72:13–16.

MAEDA, T.; SHIBAHARA, T.; KIMURA, K.; WADA, Y.; SATO, K.; IMADA, Y.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. **J. Comp. Pathol.** 2003, 129, 100–110.

MAHDIZADEH S., SAWFORD K., VAN ANDEL M., BROWNING G.F. Efficacy of citric acid and sodium hypochlorite as disinfectants against *Mycoplasma bovis*. **Vet. Microbiol.** 2020;243:108630.

MANZI M.P., JOAQUIM S.F., GUIMARÃES F.F., BRUDER-NASCIMENTO A.C.M.O., PANTOJA J.C.F. & LANGONI H. 2018. Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. **Pesq. Vet. Bras.** 38(4):665-669.

MANZI, M.P. Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras do interior do estado de São Paulo. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva). 37p. Botucatu. Unesp, 2014.

MAUNSELL F.P. WOOLUMS A.R. FRANCOZ D. ROSENBUSCH R.F. STEP D.L. WILSON D.J. JANZEN E.D. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. **J. Vet. Intern. Med.** 2011; 25 (21745245): 772-783

MAUNSELL, F., M. B. BROWN, J. POWE, J. IVEY, M. WOOLARD, W. LOVE, AND J. W. SIMECKA. 2012. Oral inoculation of young dairy calves with *Mycoplasma bovis* results in colonization of tonsils, development of otitis media and local immunity.

MAY, M., BALISH, M. F., & BLANCHARD, A. (2014). The Order Mycoplasmatales. **In The Prokaryotes** (pp. 515-550). Springer Berlin Heidelberg.

METTIFOGO, E.; NASCIMENTO, E. R.; MÜLLER, E. E.; NASCIMENTO, M. G. F.; FREITAS, J. C. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 18, p. 22-25, 1996.

METTIFOGO, E. & TAMASO, E. (2013). Mastite por *Mycoplasma bovis*: surtos em Minas Gerais levam ao descarte de animais produtivos. São Sebastião do Paraíso: Qually Milk, 2013. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/256484675 Mastite por Mycoplasma bovis surtos em Minas Gerais levam ao descarte de animais produtivos](https://www.researchgate.net/publication/256484675_Mastite_por_Mycoplasma_bovis_surtos_em_Minas_Gerais_levam_ao_descarte_de_animais_produtivos)>. Acesso em 30 de novembro de 2022.

MORA, M.; DONATI, C.; MEDINI, D.; COVACCI, A.; RAPPUOLI, R. Microbial genomics and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p. 532-536, 2006.

MULONGO, M., PRYSLIAK, T., SCRUTEN, E., NAPPER, S., PEREZ-CASAL, J., 2014. In vitro infection of bovine monocytes with *Mycoplasma bovis* delays apoptosis and suppresses production of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha but not interleukin-10. **Infect. Immun.** 82, 62–71.

MULONGO M, PRYSLIAK T, PEREZ-CASAL J. Vaccination of feedlot cattle with extracts and membrane fractions from two *Mycoplasma bovis* isolates results in strong humoral immune responses but does not protect against an experimental challenge. **Vaccine** 2013;31:1406-12.

MUTHUSAMY, S. et al. Evaluation of interobserver reliability of Nugent score for diagnosis of bacterial vaginosis. **Indian J Sex Transm Dis AIDS**, vol. 39, n. 2, p. 120-123, 2018.

NETO, F. P.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras - revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 1679–7353, 2011.

NICHOLAS, R.A.J. (1997). The other *M. bovis*: *Mycoplasma bovis*. **State Veterinary Journal**, 7, 399-402.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; STIPKOVITS, L. P. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. **Vaccine**, v. 20, n. 29–30, p. 3569–3575, out. 2002.

NICHOLAS RA, AYLING RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. **Res Vet Sci** 2003;74:105-12.

NICHOLAS, R.; AYLING, R.; MCAULIFFE, L. *Mycoplasma Diseases of Ruminants*, 1st ed.; CABI Publishing: Oxford, UK, 2008.

NICHOLAS, R.A.J., AYLING, R.D. & MCAULIFFE, L. (2009). Vaccines for *Mycoplasma* diseases in animals and man. **J. Comp. Pathol.**, 140(2-3), 85-96.

NICHOLAS, R. A. J. (2011). Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. **The Veterinary Record**, 168(17), 459-462.

NICHOLAS R.A.J., FOX L.K. & LYSNYANSKY I. 2016. *Mycoplasma mastitis* in cattle: to cull or not to cull. **Vet. J.** 216:142-147

O'FARRELL K., DILLON P., MEE J., CROSSE S., NNOLAN M., BYRNE N., REIDY M., FLYNN F., CONDON T. Strategy for restocking Moorepark after depopulation following BSE. *Ir. Vet. J.* 2001;54:70–75.

OLIVEIRA, G. C. et al. Perfil microbiológico de Streptococcus spp. como agentes causadores de mastites clínicas em diversas regiões do Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 74-74, 2016.

ORTOLANI, E. L.; SOUSA, R. DOS S.; OLIVEIRA, F. L. C. DE; MINAMI, N. S.; DIAS, M. R. B. Complexo Respiratório Em Vacas Leiteiras: Uma Perspectiva. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife-PE, v. 19, n. 3, p. 43–48, 2016.

PANCIERA, R. J.; CONFER, A. W. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 26, n. 2, p. 191–214, 2010. Elsevier Ltd.

PEREZ-CASAL, J., PRYSLIAK, T., MAINA, T., SULEMAN, M. AND JIMBO, S. (2017). Status of the development of a vaccine against Mycoplasma bovis. **Vaccine**, 35(22), pp.2902- 2907.

PICCININI, R., GOSNEY, F., SNEL, G.G.M., LUINI, M.V., NICHOLAS, R.A.J., 2015. Environmental survival of Mycoplasma bovis on a white veal farm. **Vet. Rec. Case Rep.** 3.

PFUTZNER FL, BAUMGÄRTNER B. & WEHNERT C (1986). - Die Bekämpfung der Mykoplasmeninfektion des Rindes. **Mh. VetMed.**, 41, 577-579.

PFUTZNER, H. & SACHSE, K. (1996). Mycoplasma bovis as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. **Rev Scientifique et Technique de l'OIE**, 15(4), pp.1477-1494.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: Counter Attack. Naperville: Babson Bros, 1991. 150p.

PRETTO, L., MÜLLER, E., FREITAS, J., METTIFOGO, E., BUZINHANI, M., YAMAGUTI, M. AND SALVADOR, R. (2001). Mastite bovina por Mycoplasma bovis em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 21(4), pp.143-145.

PRYSLIAK T., VAN DER MERWE J., PEREZ-CASAL J. Vaccination with recombinant *Mycoplasma bovis* GAPDH results in a strong humoral immune response but does not protect feedlot cattle from an experimental challenge with *M. bovis*. **Microb. Pathog.** 2013;55:1–8.

PRYSLIAK T., PEREZ-CASAL J. Immune responses to *Mycoplasma bovis* proteins formulated with different adjuvants. *Can. J. Microbiol.* 2016;62:492–504.

PRYSLIAK T., MAINA T., YU L., SULEMAN M., JIMBO S., PEREZ-CASAL J. Induction of a balanced IgG1/IgG2 immune response to an experimental challenge with *Mycoplasma bovis* antigens following a vaccine composed of Emulsigen™, IDR peptide1002, and poly I:C. *Vaccine.* 2017;35:6604–6610.

PRYSLIAK T., MAINA T., PEREZ-CASAL J. Th-17 cell mediated immune responses to *Mycoplasma bovis* proteins formulated with Montanide ISA61 VG and curdlan are not sufficient for protection against an experimental challenge with *Mycoplasma bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018;197:7–14.

PUNYAPORNWITHAYA, V. et al. Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis* mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study. **Preventive veterinary medicine**, v. 98, n. 1, p. 74–78, jan. 2011.

QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC. *Mycoplasmas*. In: *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: **Artmed**; 2005. p.193-9.

QUINN PJ, MARKEY BK, CARTER ME, DONNELLY WJ, LEONARD FC. Causas bacterianas de mastite bovina. In: *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: **Artmed**; 2005. p.451-60.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos*. 9. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002. 1772 p.

RAZIN, S. AND FREUNDT, E.A., 1984. Class 1. Mollicutes Edward and Freundt 1967. In: N.R. Kreig and J.G. Holt (Editors), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 740-793.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR, v. 62, n. 4, p. 1094–1156, Dez. 1998.

RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PANTOJA, J. C. F. Mastite em animais domésticos. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. *Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia*. Rio de Janeiro: **Rocca**, 2016. p.1155-1205.

RIDLEY A., HATELEY G. *Mycoplasma bovis* investigations in cattle. **Vet. Rec.** 2018;183:256–258.

- RIFATBEGOVIC, M., ASSUNÇÃO, P. & PASIC, S. (2009). Protein and antigenic profile among *Mycoplasma bovis* field strains isolated in Bosnia Herzegovina. **Acta Vet.**, 78, 151-154.
- RODRIGUES, WC. *Mycoplasma bovis*: SOROPREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS EM BOVINOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ, BRASIL. 2019. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Paraná. Setor Palotina, Departamento de Ciências Veterinárias, 2019.
- ROSS, R.F. Mycoplasmal diseases. In: STRAW BE, D'ALLAIRE S, ENGELING WL, TAYLOR DJ. Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, Cap.36, 7 p. 495–505. 1999.
- ROTTEM,S., 2003. Interaction of mycoplasmas with hostcells. **Physiol. Rev.** 83, 417–432.
- ROTTEM S, BARILE MF (1993) Beware of mycoplasmas. **Trends. Biotechnology.** 11: 143-151.
- RUHNKE, H. L. 1994. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. Pages 56–61 in *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*. H. W. Whitford, R. F. Rosenbusch, and L. H. Lauerman, ed. Iowa State University Press, Ames.
- SACHSE K., PFÜTZNER H., HOTZEL H., DEMUTH B., HELLER M. & BERTHOLD E. 1993. Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. **Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.** 12:571-580.
- SACHSE, K., PFÜTZNER, H., HOTZEL, H., DEMUTH, B., HELLER, M., & BERTHOLD, E. (1993). Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. **Revue Scientifique Et Technique Office International Des Epizooties**, 12, 571-571.
- SACHSE K, HELBIG JH, LYSNYANSKY I, GRAJETZKI C, MULLER W, JACOBS E, et al. Epitope mapping of immunogenic and adhesive structures in repetitive domains of *Mycoplasma bovis* variable surface lipoproteins. **Infect Immun** 2000.68:680-7.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: **Manole**, 2007. 314 p.
- SCHATZMAYR, H. (2003). Novas perspectivas em vacinas virais. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 10(suppl 2), pp.655-669.

SHIMKETS, L.; WOESE, C. R. A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, n. 20, p. 9459–9463, Out.1992.

SIBILA, M.; BERNAL, R.; TORRENTS, D.; RIERA, P.; LLOPART, D.; CALSAMIGLIA, M.; SEGALÉS, J. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.127, p.165-170, 2008.

SNOWDER, G. D.; VLECK, L. D. VAN; CUNDIFF, L. V.; BENNETT, G. L. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 1999–2008, 2006.

SLOMPO, D.; BERTAGNON, H. G.; HORST, E. H.; NEUMANN, M.; MAREZE, J.; SOUZA, A. M. DE.; STADLER, E. S.; GOLDONI, I.; ASKEL E. J. Management of the confined bovine respiratory complex: Review. **PUBVET**. V.11,n.4,p.381-392, Abr. 2017.

SOEHNLEN M.K., AYDIN A., LENGERICHE E.J., HOUSER B.A., FENTON G.D., LYSCZEK H.R., BURNS C.M., BYLER L.I., HATTEL A.L., WOLFGANG D.R. Ensaio de campo cego e controlado de duas vacinas de bacterina *Mycoplasma bovis* comercialmente disponíveis em bezerros de vitela. **Vacina**. 2011; 29:5347–5354.

STIPKOVITS, L; RIPLEY, P; PALFI, V; VARGA, J. Clinical Study of the Disease of Calves associated with *Mycoplasma bovis* Infection. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 11, n. August, p. 673–676, 2011.

SUBRAMANIAM, S., BERGONIER, D., POUMARAT, F., CAPAUL, S., SCHLATTER, Y., NICOLET, J., & FREY, J. (1998). Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. **Molecular and cellular probes**, 12(3), 161-169.

SULYOK KM, KREIZINGER Z, FEKETE L, HRIVNÁK V, MAGYAR T, JÁNOSI S, SCHWEITZER N, TURCSÁNYI I, MAKRAI L, ERDÉLYI K, GYURANECZ M. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe. **BMC Vet Res**. 2014;**10**:256.

SULEMAN M, PRYSLIAK T, CLARKE K, BURRAGE PH, WINDEYER MC, PEREZ-CASAL J. *Mycoplasma bovis* isolates recovered from cattle and bison (*Bison bison*) show differential in vitro effects on PBMC proliferation, alveolar macrophage apoptosis and invasion of epithelial and immune cells. **Vet Microbiol** 2016;**186**:28-36.

SUN, Z, et al., Identification of novel immunogenic proteins from *Mycoplasma bovis* and establishment of an indirect ELISA based on recombinant E1 beta subunit of the pyruvate dehydrogenase complex, **PLoS One** 9 (2) (2014).

SVENSSON, C.; LIBERG, P. The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 73, n. 1, p. 43–53, 2006.

Szacawa E, Horecka A, Bednarek D, Niemczuk K. Antibiotic resistance and the mechanisms of its development in the case of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. **Med Weter.** 2014;**70**:396–399.

TAMASO, E. ; SALVADOR, ROGÉRIO ; METTIFOGO, E. . Outbreaks of mastitis caused by in Minas Gerais' herds, Brazil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** , v. 8, p. 419- 425, 2014.

TAYLOR, J. D., FULTON, R. W., LEHENBAUER, T. W., STEP, D. L., & CONFER, A. W. (2010). The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors. **The Canadian Veterinary Journal**, 51(10), 1095-102.

Technical Advisory Group (TAG) Report. 2019 Available online: <https://www.mpi.govt.nz/dmsdocument/37754-report-of-the-mycoplasma-bovis-technical-advisory-group-tag-in-response-to-the-terms-of-reference-june-2019-18-october-2019>.

TOMAR, N. AND DE, R. (2010). Immunoinformatics: an integrated scenario. **Immunology**, 131(2), pp.153-168.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. D.; PICCININ, A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas–revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, p. 1-7, 2008.

URBANECK D, LIEBIG F, FORBRIG T, STACHE B. Experiences with the use of herdspecific vaccines against respiratory infections with *Mycoplasma bovis* I a large cattle herd. **Der Praktische Tierarzt** 2000;**81**:756-63.

VAHANIKKILA N., POHJANVIRTA T., HAAPALA V., SIMOJOKI H., SOVERI T., BROWNING G.F., PELKONEN S., WAWEGAMA N.K., AUTIO T. Characterisation of the course of *Mycoplasma bovis* infection in naturally infected dairy herds. **Vet. Microbiol.** 2019;**231**:107–115.

VANDEN BUSH, T.J., ROSENBUSCH, R.F., 2002. *Mycoplasma bovis* induces apoptosis of bovine lymphocytes. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 32, 97–103.

VECHIATO, T.A.F. Estudo retrospectivo e prospectivo da presença de abscessos hepáticos em bovinos abatidos em um frigorífico Paulista. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica, 2009.

WAITES, K. B.; TALKINGTON, D. F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. **Clin Microbiol Rev.** v. 17, n. 4, p. 697-728, 200

WANG Y., ZHOU Y., ZHANG J., WANG X., LV T., SHI X., HUANG H., BAI F., WU Q., HAO Y. iTRAQ-based proteomic analysis of *Mycoplasma bovis* NM-28 strain from two generations for vaccine screening. *Vaccine*. 2020;38:549–561.

WEISBURG, W. G., TULLY, J. G., ROSE, D. L., PETZEL, J. P., OYAIZU, H., YANG, D., ... & VAN ETTEN, J. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of bacteriology*, 171(12), 6455-6467.

WILSON DJ, SKIRPSTUNAS RT, TRUJILLO JD, et al. Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. *J Am Vet Med Assoc* 2007;230:1519–1523.

WOESE, C. R., MANILOFF, J., & ZABLEN, L. B. (1980). Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1), 494-498.

ZBINDEN C, PILO P, FREY J, BRUCKMAIER RM, WELLNITZ O. The immune response of bovine mammary epithelial cells to live or heat-inactivated *Mycoplasma bovis*. *Vet Microbiol* 2015;179:336-40.

ZHANG, R. et al. Attenuated *Mycoplasma bovis* strains provide protection against virulent infection in calves. *Vaccine*, v. 32, n. 25, p. 3107–3114, maio 2014.

CAPÍTULO 1

Seleção, caracterização, purificação e avaliação antigênica de proteínas recombinantes de *Mycoplasma bovis* para estratégia vacinal e/ou diagnóstica.

Seleção, caracterização, purificação e avaliação antigênica de proteínas recombinantes de *Mycoplasma bovis* para estratégia vacinal e/ou diagnóstica.

Júlio César Braga de Souza¹, Bruna Carolina de Brito Guimarães², Wanderson Souza Neves¹, Beatriz Almeida Sampaio², Camila Pachêco Gomes², Maysa Santos Barbosa³, Guilherme Barreto Campos², Bruno Lopes Bastos¹, Jorge Timenetsky³ e Lucas Miranda Marques^{1,2,3*}

¹ Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Vitória da Conquista, BA, Brasil

² Universidade Estadual da Santa Cruz (UESC), Campus Soane Nazaré de Andrade, Ilhéus - BA, Brasil

³ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

* Correspondência do autor:

Instituto Multidisciplinar em Saúde

Rua Hormindo Barros, nº 58, Quadra 17, Lote 58, Bairro Candeias – CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista, BA, Brasil

Fone +55 77 3429-2710. Fax: +55 77 3429-2710. e-mail: lucasm@ufba.com (Lucas Miranda Marques).

RESUMO

Mycoplasma bovis é um dos principais agentes etiológicos em bovinos e está presente principalmente em infecções como mastite, doenças respiratórias e artrite. O tratamento dessas doenças é limitado. Assim, a prevenção demonstra ser uma importante alternativa. Contudo, no Brasil não se tem dados sobre vacinas eficazes contra o *M. bovis*. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi a análise e seleção de proteínas conservadas em *M. bovis*, para a validação e aplicação em vacinas e teste imunodiagnóstico. Os alvos foram selecionados através de ferramentas de bioinformática, utilizando o banco de dados Uniprot para a obtenção dos proteomas. As proteínas foram avaliadas utilizando PsortB para localização subcelular. Adicionado a isso, foram realizadas as seguintes predições: presença de regiões transmembrânicas e peptídeo sinal utilizando o banco de dados TopCons. Foi avaliada ainda a homologia entre os dois proteomas de *M. bovis*, através do programa público CD-HIT. Para a predição de epítomos foi utilizado o consenso de ferramentas dispostas no IEDB, para a predição de epítomos de células B, e a utilização de NETMHCcons e NETMHCIIpan 3.1 para as predições de epítomos de células T, apresentados em vias de MHCI e MHCII, respectivamente. As proteínas selecionadas foram então, clonadas e expressas em células de *Escherichia coli*. Após a purificação, as proteínas foram avaliadas quanto a antigenicidade e validadas a partir de ensaios de *dot blotting* com soro de coelho sabidamente contaminados com *M. bovis*. A proteína A0A0Y59Y3U4 foi predita pelo consenso entre as ferramentas de bioinformática, como bom alvo ao estudo. A otimização da expressão desta seguiu com a utilização de seis linhas de *E. coli*. Entretanto, quatro dessas (Arctic, pLysS, BL21 e C41) apresentou resultado significativo, sendo a C41, apresentando o melhor rendimento. Após a purificação, a proteína foi então submetida à avaliação de reatividade contra soros sabidamente infectados com *M. bovis*, onde a proteína reagiu aos soros testados. Com isso, os resultados obtidos no presente estudo abrem-se margem para avançar com os estudos utilizando esta proteína em etapas de experimentação animal em busca de um candidato vacinal efetivos para o controle dessa enfermidade.

Palavras-chave: *M. bovis*; imunodiagnóstico; infecções bovinas; proteína recombinante; vacinologia reversa.

INTRODUÇÃO

O Brasil caracteriza-se no mercado internacional como um grande produtor de carne bovina, sendo o seu rebanho comercial o maior do mundo. É considerado um dos poucos países com reais possibilidades de expansão da produção devido ao vasto território (Cruz et al., 2014). Ainda que seja um importador de lácteos, o Brasil em 2017 foi o quarto país no ranking de produção de leite mundial (Embrapa, 2019). Com isso, *Mycoplasma bovis* torna-se um dos principais patógenos de importância em biossegurança para um rebanho, devido à sua natureza altamente contagiosa e à falta de resposta à maioria dos tratamentos (Fox, 2012). Geralmente, as espécies de micoplasma podem causar doenças em vários locais anatômicos diferentes, incluindo glândula mamária, articulações, sistema respiratório (Pfützner e Sachse, 1996) trato urogenital (Ruhnke, 1994), ocular (Alberti et al., 2006) e pavilhão auditivo (Maunsell et al., 2012).

A infecção de bovinos por *M. bovis* traz grandes prejuízos econômicos à pecuária, uma vez que, pode interferir na qualidade dos produtos cárneos e, no caso de vacas com mastite, na produção de leite, que além de queda na quantidade ordenhada, tem um decréscimo significativo em sua qualidade (Nicholas e Ayling, 2003; Fox et al., 2005; Lysnyansky et al. 2016). Em condições naturais, a infecção por *M. bovis* é difícil de identificar e fácil de confundir com outras infecções contagiosas, uma vez que o patógeno consegue mimetizar-se ao organismo do hospedeiro com facilidade e promover alterações patológicas semelhantes a outras doenças bovinas, no que diz respeito a características de sintomatologia clínica (Sun et al., 2014). Assim, o diagnóstico clínico torna-se necessário para a identificação do patógeno, com confirmação obtida por meio de cultura ou PCR do leite, fluido articular ou tecidos (Hazelton et al., 2017). Entretanto, estudos apontam o diagnóstico sorológico como alternativa mais sensível que o isolamento de *M. bovis*, especialmente para os casos crônicos ou animais tratados com antibióticos (Nicholas e Ayling, 2003; Altun e Ozdemir, 2019).

O maior problema dessa situação é a dificuldade de um tratamento que consiga erradicar o microrganismo quando aderido ao animal. A terapia com antibióticos é pouco eficiente e, muitas vezes, ocasiona o aumento da resistência antimicrobiana. Além disso até o momento, não existe uma vacina eficaz para prevenir infecções por *M. bovis* (Mullongo et al., 2013) assim, as tentativas de se encontrar uma terapêutica tornam-se dispendiosas e honorárias, sendo necessário muitas vezes medidas mais drásticas como o abate precoce e a inutilização dos produtos cárneos. Assim, aplicações da bioinformática,

possuem um impacto significativo na pesquisa imunológica, pois consiste numa abordagem *in silico* que consegue prever a interação parasito-hospedeiro e, assim, selecionar epítomos imunogênicos, tornando-se mais interessante frente à produção de vacinas tradicionais atenuadas ou inativas e produção de um imunodiagnóstico mais efetivos (Brusic e Petrovsky, 2005; Goodswen et al., 2014), dado que, tem um alto potencial em avaliar o proteoma do agente com precisão, além de promover a redução de custo e tempo (Mora et al., 2006; Perez-casal, 2017). Assim, este estudo teve por objetivo, selecionar e analisar *in silico*, proteínas antigênicas que tenham potencial à produção de vacina e/ou diagnóstico contra *M. bovis*. Clonar, expressar, purificar e avaliar reatividade frente a soros sabidamente contaminados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análises de Bioinformática

Os proteomas das cepas de *M. bovis* foram obtidos do Universal Protein Resource - UniProt (www.uniprot.org/) e armazenadas em formato FASTA para análises subsequentes. As cepas utilizadas no presente estudo foram *M. bovis* CQ-W70 (ID UP000027182 e *M. bovis* (ID UP000233776), sendo essas duas classificadas como não redundantes. Os proteomas foram então submetidos a predição de localização subcelular ao web-software PSORTb versão 3.0 (<http://www.psort.org/psortb/>) (YU et al., 2010) com o intuito de obter proteínas de membranas e extracelulares, utilizando as configurações sugeridas para *Mycoplasmas spp*, as proteínas assim preditas, foram analisadas quanto a topologia de membrana e previsão de peptídeo sinal, pelo servidor TOPCons (<http://topcons.cbr.su.se>). Proteínas de membranas com quantidade inferior ou igual à quatro regiões transmembrânicas e proteínas extracelulares com previsão de peptídeo sinal, foram selecionadas para procedência do estudo. Foi realizado ainda, um agrupamento de proteínas entre os dois proteomas do estudo, usando o web-software CD-HIT Suite (http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit_suite/cgi-bin/index.cgi). As sequências que apresentaram um nível de identidade maior que 80% foram escolhidas para continuidade da pesquisa.

Proteínas selecionadas nas análises anteriores, foram submetidas à predição de epítomos de células B feita utilizando o programa público online Immune Epitope Database – IEDB (<http://www.iedb.org/>), baseados nos parâmetros de linearidade-Bepipred- (Larsen; Lund; Nielsen, 2006), hidrofobicidade (Parker; Guo; Hodges, 1986),

flexibilidade (Karplus; Schulz, 1985), acessibilidade (Emini et al, 1985) e regiões de beta-turn (Chou; Fasman, 1978). Para todas as ferramentas foi utilizada uma janela de sete aminoácidos e um ponto de corte de 0,8 para o Bepipred e 1,0 para os demais.

Para predição de epítomos de células T, proteínas de membrana foram analisadas pelo web-server NetMHCIIpan 3.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>), utilizando uma janela de 15 aminoácidos e ponto de corte padrão. As proteínas extracelulares foram analisadas com NetMHCcons 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCcons/>), configurado para uma janela de 9 aminoácidos e ponto de corte padrão. Os alelos utilizados para as predições de epítomos de MHC classes I e II foram obtidos de acordo às informações inseridas no Immuno Polymorphism Data-base (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/group/BoLA>) para o BoLA, onde os cinco alelos bovinos mais prevalentes de cada um dos cinco genes (BoLA-1, BoLA-2, BoLA-3, BoLA-6 e BoLA-NC1) MHCI e os genes (DRB3, DQA e DQB) para MHCII foram selecionados e utilizados para predição. Para o ponto de corte, foi calculado o percentil da afinidade de ligação dada pelo web-server, em que ligações com percentil menor que 0,5 foram consideradas de ligação forte e entre 0,5 e 2,0, foram consideradas ligações fracas. Após as predições de epítomos células T, as proteínas passaram pela predição de antigenicidade pelo programa VaxiJen 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), com configuração de treshold de 0.4, sendo utilizado como último filtro para a seleção dos alvos. Para melhor conhecimento das proteínas foram, ainda, analisadas quanto à suas características físico-químicas, como, ponto isoelétrico teórico, índice de estabilidade, índice de solubilidade, composição de aminoácidos, tempo de meia vida e peso molecular pelo servidor público online ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Para predição do modelo tridimensional, foi utilizado o web-server I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>).

Construção do vetor

As seqüências preditas por bioinformática, foram destinadas à construção do plasmídeo pela empresa GeneScript. A seqüência de interesse foi inserida no vetor de expressão pET-28a(+), foi ainda utilizado as enzimas de restrição NdeI/XhoI, os códons foram otimizados para códons preferenciais de *E. coli*, o plasmídeo ainda foi construído com uma cauda de poli histidina e sítio de resistência à canamicina.

Transformação e isolamento dos plasmídeos recombinantes

A transformação de células competentes foi realizada em One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*, incluídas no kit de expressão Champion™ pET Directional TOPO ® (Invitrogen). Adicionados delicadamente 3 µL da reação de clonagem às células em transformação e incubados em gelo durante 30 minutos. Em seguida, a reação foi submetida ao choque térmico em 42°C, durante 30 segundos, sem agitação e, subsequentemente, acondicionadas em gelo. Em seguida, 250 µL de meio S.O.C foram adicionados e a solução agitada a 37°C, sob 200 RPM, durante 1 hora. Posteriormente, 150 µL de cada transformação foi plaqueadas em meio LB (Luria-Bertani) contendo 100 µg/mL de canamicina e incubado a 37°C, overnight. A partir da transformação de células, deram-se as escolhas das colônias para serem cultivadas overnight em meio LB contendo canamicina. Posteriormente, foi realizado o isolamento dos plasmídeos a partir da utilização do kit PureLink™ HQ Mini Plasmid Purification. Após o isolamento dos plasmídeos recombinantes, a colônia correta foi isolada e inoculada em 5 mL de LB contendo canamicina. Quando o crescimento atingiu a fase estacionária 900 µl da cultura pura foi adicionado a 100 µl de glicerol estéril e armazenado, sob refrigeração, à -80°C.

Expressão das proteínas recombinantes

Para a realização da expressão proteica, foram utilizadas as cepas de *E. coli* Arctic, pLysS, C41, C43, Tunner e BL21, após a otimização, a cepa C43 seguiu sendo a cepa de expressão utilizada. Inicialmente, para realização de transformação das células de expressão, foi adicionado 10 ng de DNA plasmideal em 5 mL de células *E. coli* C41 (DE3), homogeneizados delicadamente e acondicionados em gelo por 30 minutos. Posteriormente, a reação foi submetida a choque térmico durante 30 segundos, a 42°C, sem agitação e acondicionada imediatamente em gelo por 2 minutos 250mL de meio S.O.C, a temperatura ambiente, foram adicionados e incubado a 37°C, durante 30 minutos sob agitação de 200 RPM. Subsequentemente, foram adicionados 10mL de LB contendo 100 µg/mL de canamicina e 1% de glicose. O meio foi mantido overnight, à 37°C, sob agitação.

A expressão proteica foi iniciada a partir da adição de 10 ml do meio LB contendo 100 µg/mL de Canamicina, à 100 µl das células de *E. coli* transformadas e então mantidos em incubação *overnight* a 37°C, sob agitação de 180 a 200 RPM. Posteriormente, o pré-inóculo foi então inoculado em 1 litro de meio LB e submetido a 37°C e agitação, durante 3 horas, verificando a densidade óptica em espectrofotômetro a 600nm até atingir absorvância entre 0,6 e 0,8. Em seguida, foi retirada alíquotas da cultura marcando assim o tempo zero (T0), logo após, a indução foi então realizada com a adição de 1mM de IPTG, assim, a cultura foi novamente encubada sob agitação a 37°C *overnight*, da cultura induzida, foram feitas novamente alíquotas, marcando o tempo *overnight*, e juntamente com o tempo T0 foram centrifugadas (10 minutos, 4°C, 5000 RPM), em sequência foram levadas a uma corrida em gel SDS, para observar o rendimento da expressão.

O restante da cultura foi levado a centrifugação (30 minutos, 4°C, 5000 RPM) onde o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspense em 200mL de tampão RIPA, acondicionado em gelo por 30 minutos, nesse período a amostra foi levada ao vórtex por 3 vezes, em seguida foi centrifugada (40 minutos, 4°C, 5000 RPM), do lisado foi então coletado o sobrenadante e filtrado em membrana de 0,22 µm.

Análise das proteínas

Cada sedimento celular foi ressuspense em 50 µL (1:1) de tampão de amostra de SDS-PAGE 1X, fervido por 5 minutos. 10µL de cada amostra foram aplicadas em gel de poliacrilamida e levado à cuba contendo tampão de corrida. No gel ainda foi aplicado 5 µL de padrão de peso molecular. Após a corrida, as proteínas foram fixadas com ácido acético 10% e metanol 40% a 25°C e depois corado com Coomassie Blue. A cultura não induzida por IPTG, foi utilizada como controle negativo.

Purificação proteica

O lisado filtrado foi dividida em alíquotas para a purificação, em cada alíquota foi acrescido imidazol a 10mM e assim, realizado a purificação por cromatografia de afinidade em coluna contendo resina quelante de níquel. Para a purificação foram feitas diferentes concentrações de imidazol diluído em tampão Tris NaCl (10mM, 20mM, 30mM, 50mM, 100mM, 200mM, 1M). As frações foram coletadas, separadas alíquotas para análise do grau de pureza das proteínas, feitas em corrida de SDS-PAGE e

confirmadas em Western blot. Ainda, para a concentração das proteínas dessa purificação, foi realizada centrifugação em 3.000 RPM, em tubos Vivaspin MWCO 10kDa para concentração e troca de tampão, onde foi substituído o imidazol por tampão Tris NaCl.

Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford utilizando como curva padrão, a partir da concentração de 2mg/mL, diluição seriada de soro albumina bovina (BSA). Como branco foi utilizado o tampão Tris NaCl onde a proteína havia sido armazenada após a concentração. Em uma microplaca, foram adicionados 10 μ L da amostra teste ou padrão no poço em duplicata com 350 μ L do reagente de Bradford. Em seguida, a leitura da placa foi realizada a 595nm e os dados foram submetidos a análise no excel para a determinação da concentração.

Western blot

As proteínas foram analisadas por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida. Num sistema descontínuo, composto de um gel de empilhamento constituído por 4% de acrilamida - bisacrilamida. Esse gel foi pipetado sobre um gel de corrida constituído por 12% de acrilamida -bisacrilamida. A eletroforese foi realizada em tampão de migração, durante 3 horas, numa corrente de 30mA. As proteínas presentes foram visualizadas no gel corado com comassie blue. As proteínas separadas foram transferidas eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, em tampão de transferência. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S, descorada em água destilada, bloqueados com leite desnatado a 5% em PBS-T 20, por 12 horas, a 4°C. Logo após, foram realizadas três lavagens da membrana em PBS-T e incubadas com o Anti-His (1:2000) diluído em PBS-T contendo 1% de leite desnatado, durante 1:30 horas, em seguida, foram realizadas novamente três lavagens da membrana em PBS-T, e incubadas com o anticorpo secundário Anti-Mouse (1:10000) diluídos em PBS-T acrescidos de 1% de leite desnatado durante o período de 1:30 horas, por fim foram realizadas novamente três lavagens da membrana e adicionado à solução reveladora DAB + Peroxido de Hidrogênio (1:10).

Avaliação da antigenicidade

Para avaliar a antigenicidade, foram testados soros de coelhos sabidamente infectados com *M. bovis* utilizando *Dot blotting*. Os soros foram adquiridos da soroteca, em parceria com o laboratório de micoplasma da USP, foram utilizados três soros Rabbit M129 anti sera. Para isso membranas de nitrocelulose foram marcadas com círculos para evitar o extravasamento da proteína quando adicionada na membrana. O experimento foi organizado em: branco onde na membrana foram adicionados 10 µL do tampão Tris NaCl em duplicata, controle negativo e Soro 1, Soro 2, Soro 3, foram adicionados 10 µL (5,38 µg) da proteína também em duplicata. Após a secagem completa das membranas foram levadas a tubos de ensaio contendo tampão fosfato (PBS) + leite desnatado 5%, mantidos *overnight* a 4°C. Em sequência, as membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos com PBS-T. Após isso, foram incubadas por 2 horas sob agitação de 80 RPM, a 37°C. Nesse momento, com exceção do controle negativo que foi adicionado apenas PBS-T contendo Leite desnatado 1%, todas as demais amostras foram ainda adicionados soros de coelho infectado diluído na solução 1:200. Em seguida, novamente foram lavadas por cinco minutos, três vezes, e então incubados por 2 horas PBS-T contendo Leite desnatado 1% acrescidos de Anti IgG de coelho diluído (1:1000) em todos os tubos. Logo após, as membranas foram lavadas novamente seguindo esquema supracitado, estendidas em placa de petri, e adicionados a solução reveladora DAB + Peroxido de Hidrogênio (1:10). Após aguardar 3 minutos para revelação, a reação foi parada com o uso de água destilada.

RESULTADOS

Análise de Bioinformática

Os proteomas não redundantes das cepas *M. bovis* CQ-W70 (ID UP000027182), contendo 759 proteínas, e *M. bovis* (ID UP000233776), contendo 818 proteínas, foram obtidos e arquivados em formato FASTA. Após a obtenção dos proteomas pelo UNIPROT, estas sequências foram submetidas à predição de localização subcelular e estrutura secundária pelo PsortB, assim foram obtidas 163 proteínas de membrana e 8 extracelulares a partir do proteoma de *M. bovis* (ID UP000233776), 160 proteínas de superfície e 9 secretadas a partir do proteoma de *M. bovis* CQ-W70 (ID UP000027182). Com a realização do TopCons foi reduzido para um total de 98 proteínas da cepa ID UP000233776, sendo 92 proteínas de membrana e 6 secretadas. Para ID UP000027182

foram obtidos 94 proteínas totais da cepa, das quais, 89 são proteínas de superfície e 5 são extracelulares. As 192 sequências resultantes da soma dos proteomas, foram submetidas ao alinhamento. Dentre estas, 92 proteínas obtiveram redundância em suas sequências, chegando, assim, às proteínas conservadas entre as onze cepas de *M. bovis* depositadas no UNIPROT. Logo, estas foram direcionadas às análises posteriores.

Após o agrupamento de proteínas semelhantes, as 92 proteínas conservadas entre os proteomas, foram levadas para a predição de células B lineares. Destas, 46 proteínas não apresentaram consenso entre as predições realizadas e, por isso, foram descartadas do estudo. Em contrapartida, 46 proteínas apresentaram regiões epitópicas, com variações de 1 a 48 regiões. Entre elas, apenas as proteínas que tinham, no mínimo quatro epítomos foram selecionadas, restando assim, 23 proteínas.

Para a via de MHC de I, foram preditas com base nos cinco alelos bovinos mais prevalentes de BolA-1, BolA-2, BolA-3, BolA-6 e BolA-NC1, as proteínas A0A059Y4U3 e A0A0598A8, ao final da predição, essas proteínas apresentaram respectivamente 18 e 26 epítomos. Em relação à via de MCH de classe II, foram analisadas as 23 proteínas restantes no estudo. Nesta etapa do presente estudo, as proteínas foram selecionadas com base na promiscuidade de seus determinantes antigênicos, dessa forma, foram eliminadas as proteínas que tiveram um valor menor que 80% de conservação de epítomos nos alelos testados. O fluxograma que representa as etapas de seleção dos prováveis alvos vacinais deste estudo é demonstrado na Figura 1.

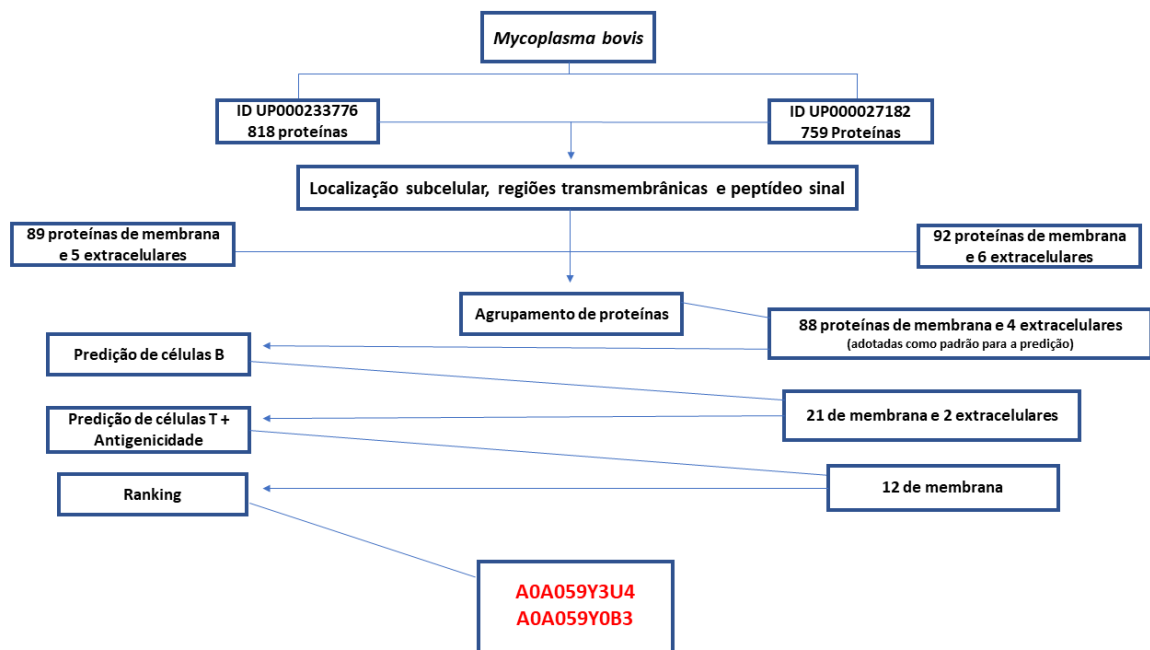


Figura 1: Fluxograma representativo das etapas de análise do proteoma de *M. bovis*, através de ferramentas de bioinformática e a seleção de proteínas de acordo características estabelecidas como preferenciais para cada teste realizado.

A antigenicidade foi testada pelo VaxiJen para as 23 proteínas, sendo excluídas 11 proteínas, por serem não antigênicas. Dentre as 12 proteínas mais antigênicas duas proteínas classificadas como boas candidatas a alvos vacinais nas demais etapas, foram então selecionadas para seguir no estudo (Tabela 1).

Tabela 1: Características das proteínas, utilizadas como filtro de seleção e informações de conhecimento como patogenicidade e ontologia gênica.

ID	Nome	Localização subcelular	Ontologia Gênica	Epítotos de Células B	Epítotos de Células T	Patogenicidade	Score de antigenicidade *
A0A059Y3U4	Proteína de ligação a substrato de alquilfosfonato, transportador ABC	Membrana	Desconhecida	31	36	Patogênica	0,5236
A0A059Y0B3	Proteína não caracterizada	Membrana	Desconhecida	48	32	Patogênica	0,7897

*Score varia de 0 a 1, sendo valores mais próximos de 1 considerados mais antigênicos.

Para adquirir mais robustez no conhecimento das proteínas selecionadas, foram feitas análises estruturais pelo Jpred e I-Tasser e de patogenicidade utilizando o preditor MP3, bem como a predição de características físico-químicas das duas proteínas escolhidas. Para a análise de patogenicidade, as proteínas (A0A059Y0B3 e A0A059Y3U4) foram classificadas como patogênicas (Tabela 1). A tabela 2 expressa informações a respeito das características físico-químicas preditas pelo ProtParam. As duas proteínas ainda foram submetidas aos preditores estruturais, sendo o Jpred para análise da exposição dos epítotos de cada proteína. A acurácia dessa análise foi confirmada pela comparação com os resultados do I-TASSER. Neste, também foi realizada a predição de estrutura tridimensional das duas proteínas escolhidas (Figura 2).

Tabela 2: Características físico-químicas de proteínas alvos vacinais contra *M. bovis*

ID	Ponto Isoelétrico teórico	Índice de Solubilidade	Índice de Instabilidade	Tempo de meia vida <i>Ex vivo</i>	Tempo de meia vida <i>in vivo</i>	Peso Molecular
A0A059Y3U4	9,04	-0,747	22,91	> 20 horas > 10 horas	30 horas	51517.19
A0A059Y0B3	5,32	-0,200	37,29	> 20 horas > 10 horas	30 horas	40530.38

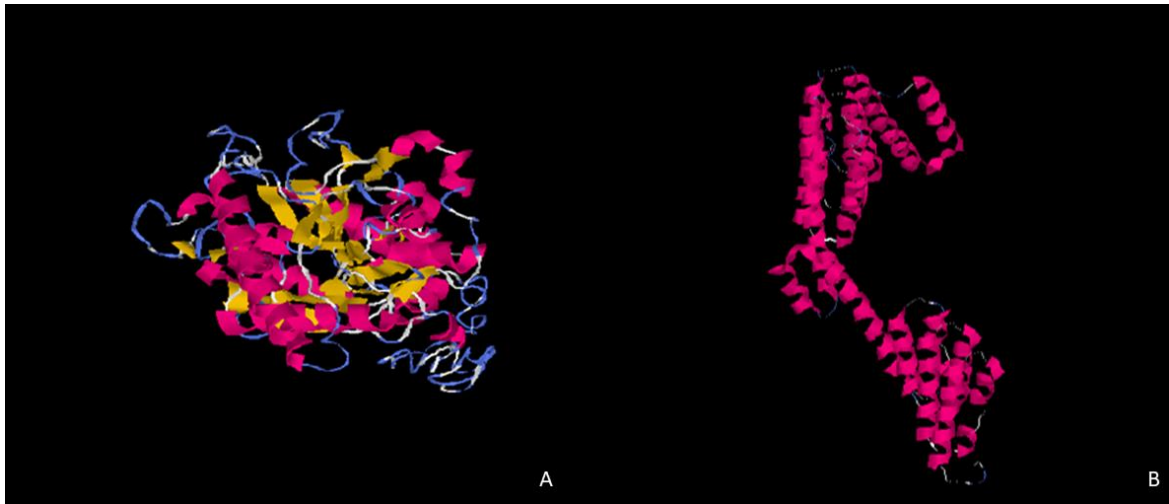


Figura 2: Estruturas tridimensionais das proteínas preditas pelo I-TASSER: A – Representa a estrutura da proteína A0A059Y3U4 e B – Representa a estrutura da proteína A0A059Y0B3.

Expressão e purificação proteica

No presente estudo, a otimização da proteína A0A059Y0B3 não foi possível. A proteína foi testada em seis cepas de *E. coli*, para as cepas (Arctic, pLysS, C41, C43 e Tunner) não houve expressão da proteína. A cepa BL21, embora tenha apresentado baixo rendimento, não houve a repetição do resultado, ainda que o experimento tenha seguido as mesmas condições de realização. A proteína A0A059Y3U4 foi submetida às seis cepas de expressão de *E. coli*, sendo realizado com condições protocoladas para cada cepa. Com as cepas C43 e Tunner não houve rendimento significativo, não sendo possível a visualização de bandas da proteína em SDS-PAGE. As cepas Arctic, pLysS, B121 e C41 foram melhor expressas, sendo que as cepas Arctic e C41 apresentaram os melhores rendimentos para a proteína. C41 foi então a cepa selecionada por apresentar o melhor resultado e melhores condições e exigências para a realização da expressão. A expressão com a cepa C41 foi possível visualizar através do SDS-PAGE (Figura 3a) e confirmada em *Western blotting* (Figura 3b).

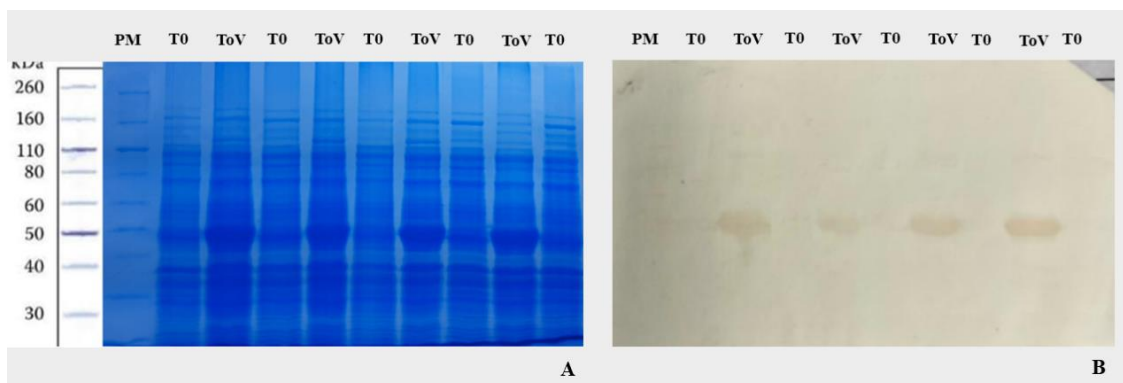


Figura 3: Expressão da proteína A0A059Y3U4. A – Visualização do sucesso da expressão em SDS-PAGE. B – Confirmação da expressão através do *Western blotting*. PM = Peso Molecular, T0 = Tempo zero, ToV = Tempo *overnigt* (após indução da expressão).

A purificação das proteínas expressas e lisadas, foi possível pela cauda de histidina presente na proteína que permite a purificação através da resina quelante de níquel que pela afinidade retém a proteína. Após sucessivas lavagens da coluna de purificação com imidazol, afim de retirar as proteínas de *E. coli* retidas, as concentrações acima de 30mM permite a passagem da proteína com maior grau de pureza e assim a sua coleta e armazenamento, possível observar ainda, que na fração de 50mM de imidazol há um maior rendimento de proteína purificada. Assim como na expressão, o sucesso da purificação é observado por SDS-PAGE (Figura 4A) e confirmada por *Western blotting*, sendo que a visualização em *Western blotting* é possível pela presença dos aminoácidos de histidina presentes na proteína visíveis na membrana em altura indicada pelo peso molecular da proteína (Figura 4B).

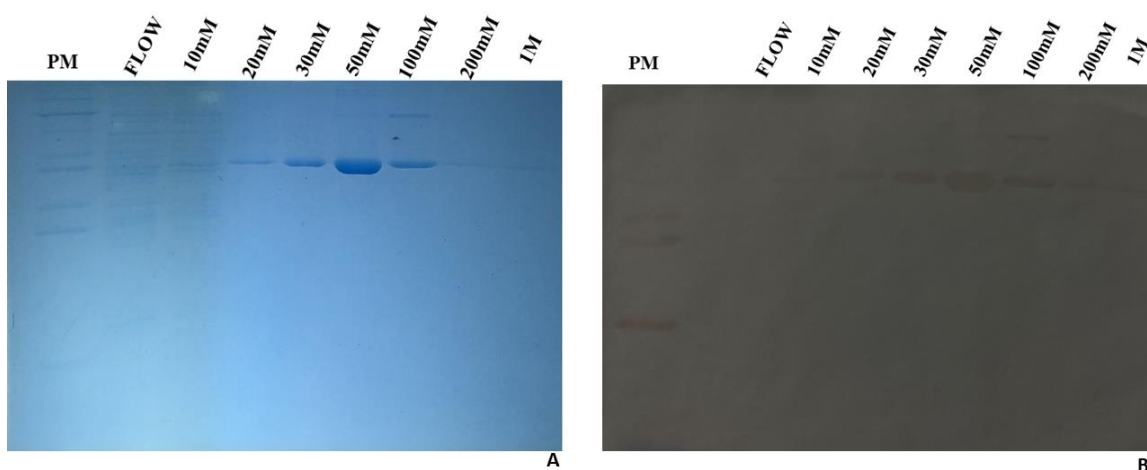


Figura 4: Purificação da proteína A0A059Y3U4. A – Visualização em SDS-PAGE do sucesso da purificação em resina quelante de níquel, onde o Flow representa a passagem da amostra lisada. B – Confirmação da purificação através do *Western blotting*.

Análise de reatividade

A reatividade da proteína aos soros é expressa na figura 5. Os três soros disponíveis para teste sabidamente contaminados com *M. bovis* demonstraram reagir quando testados em marcações com a proteína A0A059Y3U4, possível evidenciar que o soro 1 apresentou maior reatividade, seguidos pelo soro 2 e soro 3 respectivamente. A confirmação da precisão da antigenicidade é dada pelos controles (branco e negativo) onde na figura é visualizado sem nenhuma marcação de reação.

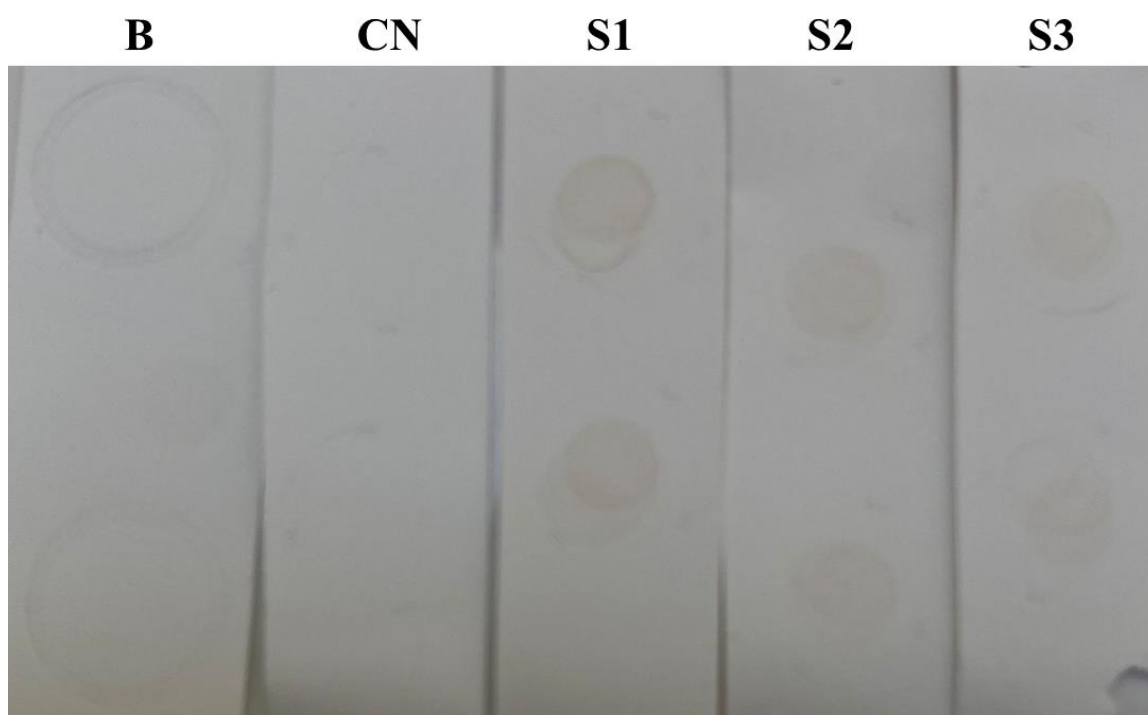


Figura 5: Análise de reatividade da proteína A0A059Y3U4 contra soros de coelhos sabidamente contaminados com *M. bovis*, onde B = branco (Soro e sem proteína), CN = controle negativo (Proteína e sem soro), S1 = Soro 1, S2 = Soro 2, S3 = Soro

DISCUSSÃO

M. bovis é um dos agentes causadores de pneumonia, mastite e artrite bovina no mundo. Assim, está se tornando um dos patógenos mais amplamente reconhecido (Registro et al., 2013; Gille et al., 2016). O microrganismo é altamente contagioso e de fácil transmissão por todo o rebanho. Além de causar pneumonia, mastite, artrite e otite, *M. bovis* pode também induzir infecção pós-parto com uma taxa de mortalidade de 80% (Burki et al., 2016). Até o momento, existem poucas vacinas disponíveis e a sua comercialização é ainda mais restrita. A terapêutica em sua grande maioria é ineficiente

para curar a doença causada pelo patógeno, com isso, a incidência da doença está em ascensão (Registro et al., 2015; Menghawar et al., 2017). Dessa forma, medidas de diagnóstico, tratamento e prevenção tornam-se imprescindíveis.

O presente estudo trouxe como alternativa o uso de ferramentas de bioinformática, evitando tempo e os custos necessários no cultivo e produção em larga escala dos patógenos para avaliação de suas características de infecção. Essa diminuição se faz necessária no cenário da pesquisa atual, por conta dos investimentos limitados (Calcutt et al., 2017). Além disso, essa metodologia fornece resultados mais acurados, permitindo, ainda, a identificação de proteínas de difícil obtenção *in vitro* (He et al., 2010). Segundo Khan et al. (2017), as descobertas do genoma de *M. bovis* com a suas sequências completas para algumas cepas possibilitou o entendimento da proteômica e assim, a identificação e melhor compreensão dos valores biológicos de novas proteínas. Contudo, a proteômica tem sido pouco discutida e utilizada, para as análises da patogenicidade de *M. bovis*, que é altamente dependente de sua membrana (Sun et al., 2014; Khan et al., 2017), uma vez que as proteínas de membrana são importantes na adesão do microrganismo à célula hospedeira (Adamu et al., 2013). Dessa forma, o conhecimento sobre a localização subcelular das proteínas para a escolha de bons alvos ao desenvolvimento de vacinas proteicas tornou-se essencial ao presente estudo. O conhecimento das proteínas de um agente infeccioso se faz necessário no entendimento principalmente das reações que estes antígenos podem desencadear. Dessa maneira, a predição de localização subcelular pode atuar dando suporte ao conhecimento das proteínas, delineando melhor o estudo (Yu et al., 2010). Por se tratar de um patógeno intracelular facultativo, as proteínas escolhidas neste estudo são de membrana, por serem, os primeiros alvos de contato com o agente em uma possível adesão a célula hospedeira para sua colonização. Com isso, com a escolha dessas proteínas, busca-se que seja estabelecida a barreira de defesa secundária, representada pela ativação dos sistemas imune humoral e celular, desencadeando no reconhecimento do antígeno pelos anticorpos.

A imunidade adaptativa é articulada pelos linfócitos, mais especificamente pelas células B e T (Goldsby et al., 2003; Sun e Zangh, 2013). Um epítopo de célula B é capaz de ser reconhecido tanto pelo anticorpo, quanto pelo receptor de linfócito B (Peters et al., 2005). No presente estudo, a predição de B foi feita usando um consenso de ferramentas de bioinformática, disponíveis no IEDB, objetivando uma maior acurácia e sensibilidade,

para obter informações importantes para a produção de vacina e diagnóstico. Este consenso analisou a acessibilidade, flexibilidade, regiões de beta-turn, hidrofobicidade e a antigenicidade das proteínas. Estas características foram usadas para a predição de epítomos lineares. Hsueh et al., (2004) encontrou 100% de especificidade no diagnóstico da síndrome respiratória aguda severa usando um ELISA constituído de peptídeo sintético formado por epítomos contínuos. Além disso, os estudos de El-Manzalawy et al. (2008) e Faria et al. (2011) corroboram com o presente estudo, ao observar que epítomos lineares tem demonstrado resultados promissores em pesquisas na identificação de antígenos vacinais, e também no imunodiagnóstico da leishmaniose.

Embora a resposta imune B, seja muito importante pela sua potente produção de anticorpos atuando na resposta imune humoral, os linfócitos T também são essenciais como foco na produção de vacinas, por se tratar de células que em conjunto aos linfócitos B, induzem as respostas caracterizadas pela presença de células de memória (Smith, 2010). No presente estudo, foram realizadas as predições de epítomos de células T, com o auxílio do NETMHCcons, para o reconhecimento de antígenos principalmente intracelulares, atuando na codificação de proteínas que reconhecem e apresentam os antígenos as células T. Esse locus gênico (MHC) em bovinos está presente no gene BOLA (Nielsen et al., 2016). Além disso, por se tratar de um microrganismo intracelular facultativo, foi realizado a predição de T, avaliados pela via de MHC II, pelo NETMHCIIpan, por se tratar de uma via que apresenta principalmente nos microrganismos extracelulares. Esses dados são corroborados, com estudos feitos por Inácio (2018), utilizando metodologia similar e apresentando bons alvos para a produção de vacinas e outras drogas contra *Toxoplasma gondii*.

A tecnologia das proteínas recombinantes em *E. coli* oferece várias vantagens para a expressão, desde alto nível à produção em larga escala de proteínas de interesse, partindo de procedimentos relativamente baratos (Gupta e Shukla, 2016). Muitas proteínas terapêuticas têm sido produzidas para aplicações clínicas e acadêmicas utilizando sistemas de expressão de *E. coli*. Das proteínas atualmente registradas e aprovadas para uso, aproximadamente 30% trata-se de proteínas recombinantes (Huang et al., 2012; Baeshen et al., 2015; Huleani et al., 2021). Os vetores pET são considerados a primeira escolha para clonagem e expressão de proteínas (Li et al., 2022). Com isso, objetivando um maior rendimento proteico a produção das proteínas no presente estudo, optou-se pela utilização do vetor pET-28a(+), o qual permite melhor otimização dos

códons preferenciais ao sistema heterólogo e associação com as cepas de linhagens de *E. coli* (Arctic, pLysS, C41, C43, Tunner e BL21) utilizadas, visando encontrar também a melhor cepa para a expressão de A0A059Y3U4 e A0A059Y0B3.

A utilização de vetores pET para expressão é bastante descrita, paralelo ao uso da cepa BL21 (DE3) como cepa de expressão das proteínas recombinantes. O DE3 em BL21 (DE3) significa que a cepa possui um plasmídeo contendo o gene para a RNA polimerase bacteriana T7 controlada pelo promotor *lac*. A presença deste plasmídeo permite que a RNA polimerase T7 seja induzida pela adição de IPTG, resultando em altos níveis de expressão de proteínas recombinantes (Studier, 2014; Hayat et al., 2018). Favorecendo a expressão e visando diminuir a possibilidade de toxicidade, foi utilizado a concentração de 1mM de IPTG, indicados pela Novagen como limite para que ocorra uma expressão ideal. Esses dados corroboram ao presente estudo, vez que a cepa apresentou resultado positivo quanto a expressão das proteínas A0A059Y3U4 e A0A059Y0B3. Contudo, para a proteína A0A059Y0B3, após a primeira expressão, não foi possível obter a repetibilidade do experimento, ainda que tenha seguido as mesmas condições utilizadas no período de otimização. Dessa forma, possibilita que outros fatores – temperatura, meio, tempo - sejam testados em momento oportuno, para que se tenha sucesso com a expressão.

Por se tratar de proteínas de membrana A0A059Y3U4 e A0A059Y0B3 foram submetidas ainda à expressão com as linhagens de expressão C41 (DE3) e C43 (DE3). Estas cepas, têm sido amplamente utilizados na produção de uma infinidade de proteínas de membrana apresentando sucesso significativo em sua aplicação. Para o presente estudo, contrariando a afirmativa supracitada, C43 (DE3) não apresentou rendimento significativo para ambas as proteínas. Contudo, corroborando aos achados na literatura a proteína A0A059Y3U4, apresentou o seu melhor rendimento na utilização da cepa de expressão C41 (DE3) (Hattab et al., 2015). Outra cepa que pode minimizar a toxicidade é a BL21 (DE3) pLysS. Segundo Ahmad (2018), essa cepa produz lisozima T7 conferindo assim, redução da expressão do nível basal do gene alvo e, por consequência a redução da toxicidade. Contudo, não foi possível observar expressão para a proteína A0A059Y0B3 e ainda que tenha ocorrido bom rendimento de expressão, BL21 (DE3) pLysS não se mostrou a melhor opção para expressar A0A059Y3U4. Sugerindo assim, que o impedimento para a expressão da proteína A0A059Y0B3, não esteja relacionada com toxicidade das cepas ou do meio de expressão.

As proteínas A0A059Y0B3 e A0A059Y3U4, foram preditas como proteínas solúveis, no processo de produção de proteínas recombinantes em células hospedeiras, busca-se manter as características preditas das proteínas. Contudo, Marco e colaboradores em 2019, relataram que durante a expressão proteica tem surgido agregados insolúveis, os chamados corpos de inclusão, a formação desses agregados impossibilita as formações de dobramentos corretos das proteínas. Dessa forma, no presente estudo foram ainda testadas a expressão das proteínas utilizando as linhagens de *E. coli* Arctic Express (DE3) e Tuner (DE3), visto que, são linhagens que contém uma região codificadora para a proteína chaperona, o que favorece o correto dobramento e montagem das proteínas recombinantes produzidas (Hayat et al., 2018; Rosano et al., 2019). Entretanto, no estudo com a utilização de Tuner (DE3), não foi possível obter expressão das proteínas. Considerando assim, que o dobramento indevido das proteínas, não sejam a causa para a não expressão destas. Enquanto para Arctic Express (DE3) a A0A059Y0B3 não apresentou expressão visível em gel, já A0A059Y3U4 obteve resultado significativo, mas não o seu melhor rendimento.

No presente estudo, as análises para expressão foram feitas quanto às linhagens de forma cautelosa, observando características das cepas que corroborassem as características das proteínas e, assim, o sucesso da expressão. Contudo, para algumas linhagens o rendimento não foi significativo, ou até mesmo imperceptível em análises de gel. Considerando, dessa forma, que outras otimizações podem ser feitas, baseadas em características específicas para as proteínas, e não relacionadas somente as linhagens de expressão. Segundo Rosano e Ciccarelli em (2014), muitas análises feitas possuem falhas explicadas pelo viés positivo, uma vez que, as coisas que funcionam são publicadas, mas aquilo que não funciona podem ser omitidas. Principalmente se estas forem soluções específicas das proteínas recombinantes.

Avanços nas tecnologias e elaboração de sistemas de expressão de proteínas, possibilitaram a produção de proteínas e peptídeos de interesse em vários tipos de estudos, permitindo muitas vezes uma produção com altos rendimentos. Contudo, uma etapa importante para a manutenção dos estudos com produção de proteínas recombinantes, é o processo de purificação das amostras (Banki et al., 2005; Saúde, 2007). Um importante método de purificação, que pode ser aplicado de forma confiável a diferentes famílias de proteínas, baseia-se em afinidades biológicas naturais entre as proteínas-alvo e seus ligantes conhecidos (Khoury et al., 2015; Asliyuce et al., 2016). No presente estudo, esse

processo foi realizado com a cromatografia de afinidade em coluna contendo resina quelante de níquel, pela presença de histidina na proteína. Estudo de Kimple e colaboradores (2013), corroboram com as escolhas feitas para o presente estudo, vez que afirmam que a utilização de proteínas marcadas com histidina, podem ser purificadas pela interação com íons de Níquel.

Ensaio de reatividade de proteínas recombinantes, e um aspecto importante na avaliação da eficácia do antígeno para testes, sejam em vacinas ou diagnóstico. No presente estudo, a proteína A0A059Y3U4 purificada, foi testada quanto a sua antigenicidade contra soros infectados com o *M. bovis*. A reatividade de anticorpos contra a proteína em soros infectados, remete à uma resposta imunológica eficaz e, portanto, denota potencial para produção de vacina e/ou diagnóstico. A avaliação da imunogenicidade neste estudo, foi realizado pelo imunoenensaio conhecido como *Dot blotting*. Segundo Pinheiro et al., (2006), esse ensaio realizado sob membrana de nitrocelulose, é um teste sensível, específico, além disso, possui baixo custo, de simples e rápida interpretação, fácil reprodutibilidade, com isso, ganha-se destaque frente a outros testes clássicos. Um dos intuitos das metodologias utilizadas no estudo, foi a redução de custos, partindo desse princípio, ressalta-se valores da membrana de nitrocelulose, utilizada no *Dot Blotting* em comparação com a placa de poliacrilamida de 96 poços, empregada no ELISA (Pedrosa, 2021). Onde as membranas de nitrocelulose possuem custo consideravelmente menores, ademais, são facilmente distribuídas por fabricantes nacionais. De acordo, Camargo e colaboradores em 1992, uma das formas de ação do *Dot Blotting* é a identificação de anticorpos contra proteínas específicas. No presente estudo, a proteína A0A059Y3U4 testada, apresentou padrão de reatividade para todos os soros testados, dessa forma, esse resultado de reatividade corrobora, com os achados da bioinformática, especialmente as predições de epítomos de célula B e o seu score de antigenicidade, onde a proteína foi prevista como antigênica.

A vacinação contra o *M. bovis* é de interesse de muitos pesquisadores ao redor do mundo. Muitas vacinas foram testadas, entretanto, poucas possuem resultados que levaram a comercialização do imunógeno. Além disso, muitas vacinas comerciais ficaram restritas em seus países de desenvolvimento (Soehnlen et al., 2011; Dudek et al., 2021). No Brasil, até o momento não há vacinas comerciais contra o patógeno (Massi, 2018). Assim, a busca por desenvolver vacinas que seja eficaz contra o microrganismo e que proteja o animal contra as diversas infecções que causa torna-se essencial. Além de

proteção, é de grande importância para a agropecuária brasileira, o desenvolvimento de testes diagnósticos que facilitem a detecção de *M. bovis* circulante, conseguindo dessa maneira, frear a disseminação com maior facilidade (Lagoni, 2013). Este estudo, possui uma visão inédita, por se tratar das novas técnicas de vacinologia reversa, com a associação da imunoinformática, visto que os dados que se tem das vacinas testadas até o momento nenhuma utiliza dessa tecnologia (Dudek et al., 2021). Investir nessa tecnologia traz inúmeros benefícios à produção. O uso da bioinformática tem avançado nos campos do diagnóstico e desenvolvimento de novas vacinas e fármacos, por se tratar de uma técnica acurada, além de diminuir o tempo de procura pelos alvos por meio de suas ferramentas, tornando o custo mais baixo, e possibilitando a escolha de proteínas que sejam conservadas entre cepas distintas (He et al., 2010). Essa abordagem tem se destacado nas novas descobertas de candidatos vacinais, a exemplo para *Cystoisospora suis* (Palmieri et al., 2017) e *Treponema pallidum* (Kumar et al., 2017).

No presente estudo, foi possível triar os proteomas de *M. bovis* com um ganho de tempo considerável, se comparado aos modelos tradicionais. Além disso, as proteínas selecionadas como potenciais alvos a produção de vacinas, foram preditas em consensos por ferramentas de bioinformática como proteínas antigênicas com boa exposição dos seus epítomos para células B e T, importantes para a promoção memória imunológica. Embora não se tenha atingido otimização da expressão com a proteína A0A059Y0B3, não anula a importância de prosseguir com o estudo em uma nova oportunidade. Contudo, corroborando aos achados na primeira etapa, *in vitro* a proteína A0A059Y3U4 demonstrou possuir sítios antigênicos, reagindo assim contra soros de animais infectados por *M. bovis*. Com isso, abre-se margem para avançar com os estudos utilizando esta proteína numa etapa de testes em animais.

REFERENCIAS

ADAMU JY, WAWEGAMA NK, BROWNING GF, MARKHAM PF. Membrane proteins of *Mycoplasma bovis* and their role in pathogenesis. **Res Vet Sci.** 2013; 95:321–325.

AHMAD, I. et al. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 144, n. October 2017, p. 12–18, 2018.

ALBERTI, A., M. F. ADDIS, B. CHESSA, T. CUBEDDU, M. PROFITI, S. ROSATI, A. RUIU, AND M. PITTAU. 2006. Molecular and antigenic characterization of a Mycoplasma bovis strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. **J. Vet. Diagn. Invest.** 18:41–51.

ALTUN S. ÖZDEMİR S. Detection of Mycoplasma bovis Infection in Cattle Mammary Tissue by Immunofluorescence and qRT-PCR Methods. **Kocatepe Vet J.** (2019) 12(2):110-115.

ASLIYUCE, S., MATTIASSON, B., & MAMO, G. (2016). Synthesis and use of protein G imprinted cryogel as affinity matrix to purify protein G from cell lysate. **Journal of Chromatography B**, 1021, 204–212.

BAESHEN MN, AL-HEJIN AM, BORA RS, AHMED MMM, RAMADÃ HAI, SAINI KS, et al. Produção de biofármacos em E. coli: cenário atual e perspectivas futuras. **J Microbiol Biotechnol.** 2015;25:953–62.

BANKI, M. R., GERNGROSS, T. U., & WOOD, D. W. (2005). Novel and economical purification of recombinant proteins: Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. **Protein Science: a Publication of the Protein Society**, 14(6), 1387–1395.

BRUSIC V, PETROVSKY N. 2005 Immunoinformatics and its relevance to understanding human immune disease. **Expert Ver. Clin Immunol.** 1, 145-157.

BURKI S, SPERGSEER J, BODMER M, PILO P. Uma linhagem dominante de Mycoplasma bovis está associada a um aumento do número de casos graves de mastite em bovinos. **Veterinário Microbiol.** 2016;196:63–6.

CALCUTT, M.J., LYSNYANSKY, I., SACHSE, K., FOX, L.K., NICHOLAS, R.A.J., AYLING, R.D. Gap analysis of Mycoplasma bovis diseases, diagnosis and control: Na aid to identify future development requirements. **Transbound Emerg Dis.** 2018;65(Suppl. 1):91–109.

CAMARGO, E. D.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A. J. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, p. 55-60, 1992.

CHOU PY, FASMAN GD. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**. 1978;47:45-148.

CRUZ, R. S.; ALEXANDRINO, E.; MISSIO, R. L.; RESTLE, J.; MELO, J. C.; PAULA NETO, J. J.; NEIVA, J. N. M.; MENDES FILHO, G. O.; SOUZA JÚNIOR, A.; DUARTE, T. D.; REZENDE, J. M.; SILVA, A. A. M. Desempenho bioeconômico de tourinhos alimentados com níveis de concentrado e farelo do mesocarpo de babaçu. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 2159-2174, 2014.

DUDEK K, SZACAWA E, NICHOLAS RAJ. Recent Developments in Vaccines for Bovine Mycoplasmoses Caused by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. **Vaccines (Basel)**. 2021 May 24;9(6):549.

EL-MANZALAWY Y, DOBBS D, HONAVAR V. Predicting flexible length linear B-cell epitopes. **Comput Syst Bioinformatics Conf** 2008; 7: 121-132.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA **Anuário do leite** 2019. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109959>>. Acesso em 9 de abr. 2020.

EMINI, E. A. et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of virology**, v. 55, n. 3, p. 836–9, 1985.

FARIA AR, COSTA MM, GIUSTA MS, ET AL. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** 2011; 5: e1310.

FOX LK, KIRK JH, BRITTEN A. *Mycoplasma* mastites: a review of transmission and control. **J Vet Med B Infect Dis Vet Pub Health** 2005;52:153-60.

FOX, L. K. 2012. *Mycoplasma mastitis*. Causes, transmission, and control. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 28:225–237.

GILLE L, PILO P, VALGAEREN BR, VAN DRIESSCHE L, VAN LOO H, BODMER M, BURKI S, BOYEN F, HAESBROUCK F, DEPPEZ P, PERDÃO B. Um novo local

de predileção de *Mycoplasma bovis*: seromas pós-cirúrgicos em bovinos de corte. **Veterinário Microbiol.** 2016;186:67–70.

GOLDSBY, R.; KINDT, T. J.; OSBORNE, P. A.; KUBY, J. **Immunology.** 5. Ed. New York: W. H. Freeman, 2003.

GOODSWEEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. Discovering a vaccine against neosporosis using computers: is it feasible? **Trends in Parasitology**, v. 30, p. 401-411, 2014.

GUPTA SK, SHUKLA P. Tecnologias avançadas para melhorar a expressão de proteínas recombinantes em bactérias: perspectivas e aplicações. **Crit Rev Biotechnol.** 2016;36:1089–98.

HATTAB, G., WARSCHAWSKI, D. E., MONCOQ, K. MIROUX, B. *Escherichia coli* como hospedeiro para determinação da estrutura proteica da membrana: uma análise global. **Sci Rep** 5, 12097 (2015).

HAYAT SMG, FARAHANI N, GOLICHENARI B, SAHEBKAR AH. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (E coli): what we need to know. **Curr Pharm Des.** 2018;24:718–25.

HAZELTON, M.S., MORTON, J.M., PARKER. A.M., SHEEHY, P.A., BOSWAR, K.L., MALMO, J., CASA, J.K. Whole dairy herd sampling to detect subclinical intramammary *Mycoplasma bovis* infection after clinical mastitis outbreaks. **Veterinary Microbiology.** V. 244. 2017

HE, Y. XIANG, Z. AND MOBLEY, H. I. T. “Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development.” **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 15, 2010.

HSUEH PR, KAO CL, LEE CN, CHEN LK, HO MS, SIA C, FANG XD, LYNN S, CHANG TY, LIU SK, WALFIELD AM, WANG CY. SARS antibody test for serosurveillance. **Emerg Infect Dis.** 2004; 10(9):1558–1562.

HUANG C-J, LIN H, YANG X. Produção industrial de terapêutica recombinante em *Escherichia coli* e seus recentes avanços. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 2012;39:383–99.

HULEANI S, ROBERTS MR, BEALES L, PAPAIOANNOU EH. Escherichia coli como hospedeiro de expressão de anticorpos para a produção de proteínas diagnósticas: significado e expressão. **Crit Rev Biotechnol**. 2021;42:756–73.

INÁCIO, M.M. Triagem in silico de candidatos vacinais contra Toxoplasma gondii. Goiás, 2018, 96p. Mestrado (Mestre em Genética e Biologia Molecular), Universidade Federal de Goiás (UFG).

KARPLUS PA, SCHULZ GE. Prediction of Chain Flexibility in Proteins - A tool for the Selection of Peptide Antigens. **Naturwissenschaften** 1985; 72:212-3.

KHAN FA, RASHEED MA, FAISAL M, MENGHWAR H, ZUBAIR M, SADIQUE U, CHEN H, GUO A. Proteomics analysis and its role in elucidation of functionally significant proteins in Mycoplasma bovis. **Microb Pathog**. 2017; 50–59.

KHOURY, G. E., KHOGEER, B., CHEN, C., NG, K. T., JACOB, S. I., & LOWE, C. R. (2015). Bespoke affinity ligands for the purification of therapeutic proteins. **Pharmaceutical Bioprocessing**, 3(2), 139–152.

KIMPLE, M. E., BRILL, A. L., & PASKER, R. L. (2013). Overview of affinity tags for protein purification. **Current Protocols in Protein Science**, 73(1), 19–23.

KUMAR JAISWAL A, TIWARI S, JAMAL SB, BARH D, AZEVEDO V, SOARES SC 2017. An In Silico Identification of Common Putative Vaccine Candidates against Treponema pallidum: A Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics Based Approach. **Int. J. Mol. Sci**. 18.

Langoni H. 2013. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras**. 33: 620-626.

LARSEN, J.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006.

LI, L., LI, H., TIAN, Q. et al. Expressão e purificação de β -lactamases recombinantes solúveis utilizando Escherichia coli como hospedeiro de expressão e pET-28a como vetor de clonagem. **Fato da Célula Microb** 21, 244 (2022).

LYSNYANSKY I, FREED M, ROSALES RS, MIKULA I, KHATEB N, GERCHMAN I, et al. Na overview of Mycoplasma bovis mastites in Israel (2004-20014). **Vet J** 2016;207:180-3.

MARCO, A., CARPENA, X., CASTILLO, V., & FERRER-MIRALLES, N. (2019). Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. **FEMS microbiology reviews**, 43(1), 53-72.

MASSI, R.P. Doença respiratória bovina por *Mycoplasma bovis* em vacas lactantes de rebanhos leiteiros de alto rendimento. Londrina, 2018, 68p. Mestrado (Mestre em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina (UEL).

MAUNSELL, F., M. B. BROWN, J. POWE, J. IVEY, M. WOOLARD, W. LOVE, AND J. W. SIMECKA. 2012. Oral inoculation of young dairy calves with *Mycoplasma bovis* results in colonization of tonsils, development of otitis media and local immunity.

MENGHWAR H, HE C, ZHANG H, ZHAO G, ZHU X, KHAN FA, FAISAL M, RASHEED MA, ZUBAIR M, MEMON AM, RIDLEY A, ROBERTSON ID, CHEN Y, GUO A. Distribuição genótipo de isolados chineses de *Mycoplasma bovis* e sua relação evolutiva com cepas de outros países. **Microb Pathog**. 2017;111:108–17.

MORA, M.; DONATI, C.; MEDINI, D.; COVACCI, A.; RAPPUOLI, R. Microbial genomics and vaccine design: refinements to the classical reverse vaccinology approach. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p. 532-536, 2006.

MULONGO M, PRYSLIAK T, PEREZ-CASAL J. Vaccination of feedlot cattle with extracts and membrane fractions from two *Mycoplasma bovis* isolates results in Strong humoral immune responses but does not protect against na experimental challenge. **Vaccine** 2013;31:1406-12.

NICHOLAS RA, AYLING RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. **Res Vet Sci** 2003;74:105-12.

NIELSEN M, ANDREATTA M 2016. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHCclass I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. **Genome Med**. 8: 33.

PALMIERI N, SHRESTHA A, RUTTKOWSKI B, BECK T, VOGL C, TOMLEY F, BLAKE DP, JOACHIM A 2017. The genome of the protozoan parasite *Cystoisospora suis* and a reverse vaccinology approach to identify vaccine candidates. **Int. J. Parasitol**. 47: 189–202.

PARKER JM, GUO D, HODGES RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**. 1986 Sep 23; 25(19):5425-32.

PEDROSA, M. L. C. Desenvolvimento de métodos diagnósticos por Dot-Blot para infecções de baixa carga de *Schistosoma mansoni*. 2021. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde, na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias). **Centro de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte, 2021.

PEREZ-CASAL, J., PRYSLIAK, T., MAINA, T., SULEMAN, M. AND JIMBO, S. (2017). Status of the development of a vaccine against *Mycoplasma bovis*. **Vaccine**, 35(22), pp.2902- 2907.

PETERS, B.; SIDNEY, J.; BOURNE, P.; BUI, H. H.; BUUS, S.; DOH, G.; FLERI, W.; KRONENBERG, M.; KUBO, R.; LUND, O.; NEMAZEE, D.; PONOMARENKO, J. V.; SATHIAMURTHY, M.; SCHOENBERGER, S. P; STEWART, S.; SURKO, P.; WAY, S.; WILSON, S.; SETTE, A. The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. **Plos Biol**, v. 3, n. 3, p. 379-381, 2005.

PFUTZNER, H. & SACHSE, K. (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. **Rev Scientifique et Technique de l'OIE**, 15(4), pp.1477- 1494.

PINHEIRO, R. R.; CHÁVEZ-OLORTEGUI, C.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAUJO, S.C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento do dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, v. 101, p. 51-56, 2006.

REGISTRO KB, WOODBURY MR, DAVIES JL, TRUJILLO JD, PEREZ-CASAL J, BURRAGE PH, CLARK EG, WINDEYER MC. Micoplasmose sistêmica com distocia e aborto em um rebanho de bisões norte-americanos (bisões bisontes). **Jornal de Investigação de Diagnóstico Veterinário**. 2013;25(4):541-545.

REGISTRO KB, THOLE L, ROSENBUSH RF, MINION FC. A tipagem da sequência multilocus de *Mycoplasma bovis* revela genótipos específicos do hospedeiro em bovinos versus bisontes. **Veterinário Microbiol**. 2015;175(1):92–8.

ROSANO, G. L., & CECCARELLI, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**, 5, 172.

ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, 2019.

Saúde, G. (2007). Recombinant protein purification handbook: Principles and methods. **GE Healthcare Bio-Sciences AB**, 14(6), 1–10.

SMITH, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Expert Rev. Vaccines*, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2010.

Soehnlen M.K., Aydin A., Lengerich E.J., Houser B.A., Fenton G.D., Lysczek H.R., Burns C.M., Byler L.I., Hattel A.L., Wolfgang D.R., et al. Blinded, controlled field trial of two commercially available *Mycoplasma bovis* bacterin vaccines in veal calves. **Vaccine**. 2011;29:5347–5354.

Studier, F. W. (2014). Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. **Methods in molecular biology** (Clifton, NJ), 1091, 17–32.

SUN Z, ZHANG X, ZHOU X, WU Y, ZHOU J, YUAN Y, ET AL. Identification of novel immunogenic proteins from *Mycoplasma bovis* and establishment of an indirect ELISA based on recombinant E1 beta subunit of the pyruvate dehydrogenase complex. **PLoS One**. 2014;9(2)

YU,N.Y., WAGNER,J.R., LAIRD,M.R., MELLI,G., REY,S., LO,R., DAO,P., SAHINALP,S.C., ESTER,M., FOSTER,L.J. ET AL. (2010) PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26, 1608–1615.