



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Diferenciação de espécies de *Mycoplasma spp* isoladas de vacas com mastite clínica, e de tanques de expansão.

Bruna Churocof Lopes

Botucatu – SP

Agosto/2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Diferenciação de espécies de *Mycoplasma spp* isoladas de vacas com mastite clínica, e de tanques de expansão.

Bruna Churocof Lopes

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre no Programa de Mestrado em Medicina Veterinária. Área de Higiene e Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

Botucatu – SP

Agosto/2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lopes, Bruna Churocof.

Diferenciação de espécies de *Mycoplasma spp* isoladas de vacas com mastite clínica, e de tanques de expansão / Bruna Churocof Lopes. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502050

1. Mastite. 2. Leite - Contaminação. 3. Micoplasma. 4. Reação em cadeia da polimerase.

Palavras-chave: Isolamento; Mastite bovina; Micoplasmoses; PCR.

Nome do autor: Bruna Churocof Lopes

Título: Diferenciação de espécies de *Mycoplasma spp* isoladas de vacas com mastite clínica, e de tanques de expansão.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni

Presidente e orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde FMVZ – UNESP – Botucatu /SP

Dr. Felipe de Freitas Guimarães

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde FMVZ – UNESP – Botucatu /SP

Dr^a. Anelise Salina

Membro

Adolfo Lutz - Laboratório – Bauru/SP

Data da Defesa: 25/08/2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força diária.

Ao meu orientador, Professor Helio Langoni, pela paciência e ensinamentos.

A FAPESP, por tornar possível o desenvolvimento deste trabalho, concedendo a bolsa de mestrado, processo nº 2018/09086-9.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade, convivência e ensinamentos!

A minha família, pelo apoio e estímulo mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha amiga e irmã Camila, que me entende e está sempre disposta a me ajudar e escutar, você fez toda a diferença!

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Primers utilizados para a pesquisa de diferentes espécies de micoplasmas em leite de vacas com mastite clínica e de tanque de expansão.	19
Quadro 2. Ciclos utilizados no termociclador para realização da reação de PCR por espécie.	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amostras de leite de tanques de expansão negativas	21
Figura 2. Resultado para mesma amostra, positiva para <i>Mollicutes</i> quando previamente concentrada e negativa quando extraída diretamente do leite homogeneizado.....	22
Figura 3. Comparação de resultados positivos e negativos utilizando o método de concentração de amostras por centrifugação (série 1) e a extração direta do leite homogeneizado (série 2).	23
Figura 4. Comparativo de resultados positivos para a classe <i>Mollicutes</i> causando mastite clínica em vacas de propriedades no Brasil.....	24

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 LEITE NO BRASIL.....	6
2.2 ASPECTOS GERAIS DA MASTITE BOVINA.....	7
2.2.1 <i>Contagem de Células Somáticas (CCS)</i>	7
2.2.3 <i>Fatores de risco para a mastite: estágio fisiológico</i>	8
2.2.4 <i>Agentes ambientais e contagiosos causadores de mastite</i>	8
2.3. GÊNERO <i>MYCOPLASMA SPP.</i>	9
2.3.1 <i>Infecções causadas por micoplasmas</i>	11
2.3.2 <i>Mastite bovina por micoplasmas</i>	12
2.4 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	14
3 HIPÓTESES DO ESTUDO	15
4 OBJETIVOS	16
4.1 GERAL.....	16
4.2 ESPECÍFICOS.....	16
5 MATERIAIS E MÉTODOS	16
5.1 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	16
5.2 PROPRIEDADES RURAIS.....	17
5.3 COLHEITA DE LEITE.....	17
5.4 ANÁLISES LABORATORIAIS.....	18
5.4.1 <i>Concentração das amostras</i>	18
5.4.2 <i>Extração DNA</i>	18
5.4.3 <i>Caracterização molecular de bactérias do gênero Mollicutes</i>	18
5.4.4 <i>Espécies de Mycoplasma spp.</i>	19
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
7 CONCLUSÕES	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXOS	38

1 LOPES, B.C., Diferenciação de espécies de *Mycoplasma spp.* isoladas de amostras
2 de leite de casos de mastite clínica e de tanques de expansão. Botucatu – SP. 2020,
3 p 45. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
4 Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

5 RESUMO

6 A mastite é a principal afecção que acomete o gado destinado à produção de leite,
7 gera prejuízos ao produtor e a indústria pela perda na produção e menor rendimento
8 no processamento industrial de derivados. Consiste em uma enfermidade com
9 caráter multifatorial de etiologia múltipla incluindo micro-organismos como bactérias,
10 vírus, fungos e algas. Entre os micro-organismos bacterianos com maior destaque
11 estão *Staphylococcus aureus* e os não aureus, todos caracterizados como
12 contagiosos, além de *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus agalactiae*. Com
13 elevada contagiosidade tem-se *Mycoplasma spp.*, com destaque para *M. bovis*, *M*
14 *bovigenitalium* e *M. californicum* patógenos considerados importantes em outros
15 países, entretanto, menos estudados no Brasil. Pelo alto grau de contagiosidade do
16 agente e os aspectos econômicos é importante monitorar a ocorrência de mastites
17 causadas por *Mycoplasma spp.*, bem como a diferenciação das espécies envolvidas
18 para a adoção de medidas de prevenção e controle da enfermidade na propriedade.
19 O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de micoplasmas, bactérias
20 do gênero *Mollicutes*, e realizar a diferenciação de espécies em amostras de leite
21 de vacas com mastite clínica, e como triagem para amostras de leite de tanques de
22 expansão (mastite subclínica), a partir de técnicas moleculares, cultivo
23 microbiológico das amostras positivas ao PCR e sequenciamento genético. Das 993
24 amostras analisadas foram encontradas 136 amostras positivas para a classe
25 *Mollicutes* utilizando a técnica de concentração por meio de centrifugação
26 previamente a extração do DNA e, utilizando as mesmas amostras, apenas 80 foram
27 positivas realizando a extração diretamente do leite, evidenciando a importância da
28 implementação da técnica na rotina de análises moleculares de amostras de leite
29 para investigação de bactérias da classe *Mollicutes*. Não foram encontradas
30 amostras positivas para as espécies testadas, *M. bovis*, *M. bovirhinis*, *M.*
31 *bovigenitalium*, *M. californicum* e *M. alkalescens*.

32 **Palavras-chave:** Mastite bovina, micoplasmoses, PCR, isolamento.

1 LOPES,B.C., Differentiation of *Mycoplasma* spp. isolated from milk samples
2 from clinical mastitis cases and bulk tanks milk. Botucatu – SP. 2020, p 45.
3 dissertation (Masters) – , São Paulo State University (UNESP), Botucatu

4 **ABSTRACT**

5 Mastitis is the main affection that affects cattle destined for milk production, it
6 generates losses to the producer and the industry due to the loss in production
7 and lower yield in the industrial processing of derivatives. It consists of a
8 disease with a multifactorial character of multiple etiology including
9 microorganisms such as bacteria, viruses, fungi and algae. Among the most
10 prominent bacterial microorganisms are *Staphylococcus aureus* and non-
11 *aureus*, all characterized as contagious, in addition to *Corynebacterium bovis*
12 and *Streptococcus agalactiae*. *Mycoplasma* spp. Is highly contagious, with
13 emphasis on *M. bovis*, *M. bovirhinis* and *M. californicum* pathogens
14 considered important in other countries, however, less studied in Brazil. Due to
15 the high degree of contagiousness of the agent and the economic aspects, it is
16 important to monitor the occurrence of mastitis caused by *Mycoplasma* spp, as
17 well as the differentiation of the species involved for the adoption of disease
18 prevention and control measures on the property. The objective of the present
19 study was to investigate the presence of mycoplasmas, bacteria of the genus
20 Mollicutes, and to differentiate species in milk samples from cows with clinical
21 mastitis, and as a screening for milk samples from expansion tanks (subclinical
22 mastitis), the from molecular techniques, microbiological culture of PCR positive
23 samples and genetic sequencing. Of the 993 samples analyzed, 136 positive
24 samples were found for the Mollicutes class using the concentration technique
25 by means of centrifugation prior to DNA extraction and, using the same
26 samples, only 80 were positive performing the extraction directly from milk,
27 showing the importance of implementation of the technique in the routine of
28 molecular analyzes of milk samples for investigation of bacteria of the
29 Mollicutes class. No positive samples were found for the species tested, *M.*
30 *bovis*, *M. bovirhinis*, *M. bovirhinis*, *M. bovirhinis*, *M. californicum* and *M. alkalescens*

31 **Key-words:** PCR, bacterial isolation, bovine mastitis, micoplasmosis.

1 INTRODUÇÃO

Assegurar a integridade e a qualidade do leite e seus derivados, bem como suas características sensoriais, tem sua importância evidenciada devido ao seu importante papel nutricional na dieta humana, fornecendo carboidratos, proteínas, gorduras e sais minerais (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

A bovinocultura leiteira tem como um dos principais obstáculos a mastite, tanto pelos prejuízos econômicos, devido a queda na produção e qualidade do leite, quanto pelos custos com tratamentos e descarte precoce de vacas com mastite crônica. Trata-se de processo inflamatório da glândula mamária de origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e principalmente infecciosa. Sendo uma doença complexa e é causada por vários fatores que envolvem o ambiente, patógenos e também alguns fatores relacionados ao próprio animal (BRESSAN, 2000).

Além das perdas econômicas, é importante ressaltar os riscos à saúde pública devido aos patógenos potencialmente infectantes para humanos, quer seja pela sua ação direta causando infecção, bem como pela produção de suas toxinas no leite, ocasionando graves toxiiinfecções alimentares (SANTOS, 2001; SÁ et al., 2004; DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013; LANGONI, 2013).

Em decorrência a essa patologia, também ocorre a alteração do parênquima da glândula mamária. A enfermidade pode se apresentar sob duas formas: clínica e subclínica. No primeiro caso é possível observar alterações da glândula mamária, como edema, aumento de temperatura local, hiperemia, sensibilidade, nódulos e abscessos, bem como o aparecimento de grumos, pus, sangue e dessora do leite. Estas condições acabam causando prejuízos significativos à cadeia produtiva do leite, pois há descarte do leite, gastos com medicamentos, perda funcional de glândulas, descarte precoce de fêmeas e morte ocasional do animal (LANGONI, 2013).

A mastite subclínica caracteriza-se por alterações na composição do leite, entretanto, o produto mantém suas características macroscópicas normais. Por outro lado, ocorrem alterações relacionadas ao aumento no

número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura (COSTA et al, 2003; RIBEIRO et al, 2016). Esse tipo de mastite impacta negativamente a cadeia produtiva do leite, principalmente pela queda de produção nos tetos infectados independente do agente causador, bem como pela depreciação de sua qualidade de acordo com a IN 77 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2018).

Sendo as mastites de origem infecciosa as mais importantes na produção leiteira, destaca-se os micoplasmas que são a forma mais simples de organismos auto replicante, não apresentam parede celular bacteriana típica e invadem diretamente a célula hospedeira para obter nutrientes essenciais (TORTORA et al., 2012). Estes organismos são considerados importantes na etiologia das mastites contagiosas, mas, pouco pesquisados no Brasil, provavelmente devido aspectos limitantes para o seu isolamento na rotina microbiológica para o diagnóstico da mastite.

Hale et al. (1962) relataram o primeiro caso de mastite bovina por *Mycoplasma agalactiae* subesp. *bovis*., posteriormente denominado de *Mycoplasma bovis*. No Brasil, a primeira citação de mastite por *M. bovis* foi de Mettifogo et al. (1996) na região de Londrina, Estado do Paraná.

A mastite causada por bactérias do gênero *Mycoplasma* spp. caracteriza-se pelo seu aparecimento súbito, formação de secreção purulenta nos quartos afetados, rápida transmissão para o rebanho, redução significativa na produção de leite e resistência ao tratamento com antimicrobianos convencionais. Embora existam várias espécies, a mais frequente na casuística de mastite é *Mycoplasma bovis* (PHILPOT e NICKERSON, 2002), responsável por surtos esporádicos de alta contagiosidade.

A introdução do *M. bovis* em rebanhos livres da doença normalmente se dá pela aquisição de animais portadores. Quando introduzido no rebanho, o micro-organismo dissemina-se durante a ordenha por aerossóis e secreções de animais, com sinais respiratórios e por secreções genitais. Uma vez contaminado, as vias hematogena e linfática possibilitam a disseminação do agente para diferentes órgãos do animal (SACHSE et al., 1993). O agente coloniza superfícies mucosas, podendo persistir sem causar doença clínica. A

mucosa do trato respiratório superior é o principal local para sua colonização. Nos EUA foram estimadas perdas de 108 milhões de dólares/ano para a indústria de laticínios em função da micoplasmose em vacas leiteiras (ROSENGARTEN, et al. 1999).

Desta forma, a principal medida de controle das mastites por *M. bovis* é a identificação de animais infectados. Paralelamente, são recomendadas medidas preventivas para mastites de origem contagiosa como a higiene de ordenha, imersão dos tetos em solução antisséptica antes e após a ordenha, desinfecção e manutenção dos equipamentos (GUNNING & SHEPHERD 1996), além da manutenção e higienização frequente do ambiente de ordenha e dos locais onde os animais são estabulados (LANGONI, 2013).

Assim, de acordo com a importância da mastite na produção leiteira, em toda cadeia produtiva, e da alta contagiosidade dos micoplasmas, levando a grandes prejuízos econômicos e perdas de qualidade do produto, objetivou-se o presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite no Brasil

O leite é um dos produtos de origem animal com maior valor nutricional associado e está presente na alimentação humana, assim como seus derivados, sendo fonte indispensável de proteínas, gordura, vitaminas e minerais. A recomendação de consumo do leite e seus derivados são de 200 kg/pessoa/ano, divididas em três porções diárias (BRASIL, 2014). No Brasil, o consumo médio do produto *per capita* é inferior a um copo de leite diário, cerca de 170mL (FAO, 2018).

No mundo, foram produzidos, em 2018, cerca de 827,9 bilhões de litros de leite, 90,7% na Ásia, Europa e América, destes, 33,49 bilhões de litros no Brasil. Mesmo com queda de produção de 0,5% de 2016 para 2017, o Brasil ocupa a terceira colocação entre os maiores produtores do mundo (FAO, 2018) e, aproximadamente 80% de todo o leite brasileiro tem sua produção concentrada em cerca de 20% das fazendas produtoras (EMBRAPA, 2018). Em 2016, o número total de vacas ordenhadas atingiu 19,7 milhões de animais, o equivalente a 9% do total de bovinos nos países.

Considerando a posição de destaque como produtor leiteiro no mundo, o Brasil possui uma produtividade média de leite por animal aquém dos países desenvolvidos, visto que, nos Estados Unidos tem-se uma média de 10.400 litros/vaca/ano e no Brasil de 1.709 litros/vaca/ano (USDA, 2018). Além disso, cerca de 30% do leite produzido no país é feito de maneira informal, ou seja, não passa por inspeção sanitária, aspecto esse relevante ao se considerar o risco para a saúde pública (LANGONI, 2013).

O comprometimento da produtividade por animal deve-se a vários fatores, incluindo raça, manejo nutricional e características do próprio animal (LEME et al., 2005), bem como condições climáticas que podem levar ao estresse térmico (WEST, 2003) e, principalmente, a doenças no rebanho, destacando-se a mastite, como principal afecção relacionada às perdas econômicas (HOGEVEEN et al., 2011).

2.2 Aspectos gerais da mastite bovina

A mastite é a afecção mais importante que acarreta em perdas econômicas e de qualidade do produto na bovinocultura leiteira. Essa patologia acomete de 23 a 40% dos rebanhos em lactação (SORDILLO e STREICHER, 2002; BRADLEY et al., 2007). Ela é definida como inflamação da glândula mamária causada por alterações no tecido glandular, além de acarretar alterações de celularidade, físico-químicas e organolépticas do leite (RUEGG, 2012). Pode ser oriunda de processos traumáticos, alérgicos, fisiológicos ou infecciosos. Destacam-se as mastites causadas por processos infecciosos pois já foram relatados na literatura mais de 140 espécies de micro-organismos envolvidos nas mastites, sendo as bactérias as mais prevalentes, seguindo, em menor frequência, por leveduras, fungos, algas e vírus (WATTS, 1988; BRADLEY, 2002; LANGONI et al., 2011).

Os prejuízos associados à mastite nos rebanhos envolvem desde as propriedades rurais até o comércio. Estima-se que, no mundo, são perdidos de 61 a 97 euros/animal/ano, incluindo gastos com o tratamento e até o descarte precoce dos animais (BAR et al., 2008; HOGVEEN et al. 2011). O prejuízo envolve vários aspectos, destacando-se a importância de programa rígido no manejo, não somente dos animais e do ambiente mas, também aspectos relacionados as pessoas envolvidas no processo de ordenha (LANGONI, 2013).

2.2.1 Contagem de Células Somáticas (CCS)

As células de defesa (neutrófilos, macrófagos e leucócitos) e as células epiteliais de descamação do úbere passam para o leite quando ocorre um processo inflamatório, como parte do combate a infecção ou lesão presente no órgão. Essas células representam a Contagem de Células Somáticas (CCS), importante para monitorar a qualidade do leite e aspectos sanitários da glândula mamária da vaca. O uso deste recurso permite estimar a ocorrência de mastite subclínica e perdas econômicas menos evidentes na propriedade (MENDES et al., 2010).

Para o produtor, resultados elevados de CCS no rebanho significam prejuízos importantes e menor lucratividade da atividade econômica, em decorrência da diminuição da produção, gastos com medicamentos e penalidades aplicadas pelos laticínios (FERREIRA et al., 2015).

O componente do leite mais afetado quando há elevação da CCS é a lactose, devido a menor síntese deste carboidrato pela destruição do tecido secretor da glândula mamária, além do consumo, como fonte nutricional, pelos patógenos envolvidos na mastite (MACHADO et al 2000; BRASIL, 2018).

A indústria é diretamente afetada pelo leite de vacas com mastite subclínica, devido a alterações nos componentes do leite, como a diminuição do teor de gorduras, proteína e carboidratos, como a lactose, além de enzimas e minerais, devido a reação inflamatória no tecido glandular, prejudicando o rendimento na produção dos derivados lácteos e, muitas vezes, até impossibilitando determinados produtos de serem processados (LANGONI, 2000; NICKERSON et al., 2014; FERREIRA et al., 2015).

2.2.2 Fatores de risco para a mastite: estágio fisiológico

São vários os fatores que podem influenciar o risco de ocorrência da mastite no rebanho bovino leiteiro, entre eles, alguns eventos se tornam destaque, como o parto, o período de lactação e o período seco que compreende principalmente as duas semanas seguintes a secagem da vaca (WALDNER, 2011).

Durante a lactação são dois os momentos em que é observado o risco de ocorrência, no início do período, devido ao estresse sofrido após o parto e, durante a lactação, no momento da ordenha e imediatamente após, devido ao canal do teto estar dilatado, permitindo a entrada de patógenos por via ascendente (WALDNER, 2011; LANGONI, 2013).

2.2.3 Agentes ambientais e contagiosos causadores de mastite.

Os patógenos envolvidos na etiologia das mastites podem ser divididos de acordo com suas características de transmissão e ao ambiente no qual

estão mais adaptados. Os patógenos contagiosos são mais adaptados à glândula mamária, causando, com maior frequência, mastite subclínica. Em contrapartida, os agentes ambientais são mais adaptados ao ambiente e causam, predominantemente, mastite clínica.

A forma de transmissão dos patógenos contagiosos está relacionada com a higiene de equipamentos de ordenha, mãos dos ordenadores, onde o processo de infecção ocorre durante a ordenha, como ilustra o Quadro 1. Os principais agentes são *Staphylococcus aureus* (OLDE RIEKERINK et al., 2008; UNNERSTAD et al., 2009), *Staphylococcus coagulase negativa* (DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013), *Streptococcus agalactiae* (UNNERSTAD et al. 2009), *Trueperella pyogenes* (UNNERSTAD et al., 2009; RISSETI et al, 2016) e *Corynebacterium bovis* (GREEN et al, 2002, LANGONI et al, 2017), além de micoplasmas (GONZÁLEZ & WILSON, 2003)

Os patógenos ambientais são oportunistas e se encontram no ambiente, geralmente, neste caso, o contágio ocorre entre as ordenhas (FOX & GAY, 1993). Os principais agentes são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Proteus* spp. , além de algas e fungos (LANGONI, 1998; RUEGG, 2012; ALVES et al., 2017, DALANEZI et al., 2018).

2.3. Gênero *Mycoplasma* spp.

As bactérias do gênero *Mycoplasma* spp., pertencentes à classe *Mollicutes* são diferentes de outros micro-organismos pela ausência de parede celular rígida (RAZIN et al., 1998). Isso confere a elas sua característica de pleomorfismo, capacidade de formar filamentos parecido com os fungos, além da habilidade de passar por filtros utilizados para reter bactérias devido a seu menor tamanho (0,1 a 0,25 µm). Tal fato fez com que, inicialmente, fossem consideradas como vírus, pois são considerados os menores micro-organismos de vida livre autorreplicáveis (TORTORA et al., 2012).

Os antimicrobianos que atuam sobre a parede das bactérias não possuem efeito sobre os micoplasmas justamente devido à ausência da parede celular típica, por exemplo, as cefalosporinas e as penicilinas não são eficazes contra esses micro-organismos. No entanto, por outro lado, esses organismos

são sensíveis ao aquecimento e a desinfetantes comuns (ROSENBUSCH, 1994).

Para o isolamento de espécies do gênero *Mycoplasma* spp. há necessidade de meios de cultura enriquecidos devido a sua capacidade muito limitada de biossíntese (GONDAIRA et al., 2017). Assim, se faz necessário proporcionar condições de anaerobiose ou microaerofilia, dependendo da espécie, e, para visualização das colônias, é necessário o uso de microscopia sob luz transmitida, pois as colônias são diminutas com menos de 1mm de diâmetro. Quanto a sua morfologia se apresentam como característica a forma de ovo frito. Outro aspecto a ser valorizado é o tempo de desenvolvimento microbiano que é mais demorado, variando de 5 a 7 dias (QUINN et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2016).

O uso da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é um método adequado para pesquisa de bactérias do gênero *Mycoplasma* spp. devido a sua alta sensibilidade e especificidade (SUNG, 2006), tornando-o um método muito eficaz para o controle de surtos (JUSTICE-ALLEN et al., 2011; JUNQUEIRA, 2016).

Esses patógenos são considerados um dos mais contagiosos causadores de mastite em bovinos. A transmissão ocorre principalmente durante a lactação (FOX e GAY, 1993) e são considerados um problema mundial (HOUSE et al., 2011), justificando-se os estudos nessa área, na busca de sua presença nos rebanhos testados como atividade de vigilância, para o seu controle.

De todas as espécies de micoplasmas, *Mycoplasma bovis* é a maior responsável por casos de mastite e, vacas em qualquer estágio da lactação, inclusive no período seco estão susceptíveis ao agente e a uma infecção intramamária com qualquer grau de severidade, desde mastites leves a severas com acometimento sistêmico (FOX, 2012). O agente pode ser introduzido em um rebanho livre pela aquisição de animais portadores sem os devidos cuidados e medidas preventivas (NICHOLAS et al., 2016).

Pode ser disseminado no rebanho por meio de aerossóis ou por secreções genitais e respiratórias de animais doentes ou portadores do patógeno. A forma mais comum de infecções ocorre através dos equipamentos de ordenha e pelas mãos dos ordenadores. A literatura reporta uma incidência

de 0,5 a 35% de *M. bovis* como agente da mastite em muitos países (GONZÁLEZ e WILSON, 2003)

2.3.1 Infecções causadas por micoplasmas

As bactérias do gênero *Mycoplasma* spp. apresentam distribuição mundial e infecções causadas por esse micro-organismo são de alta morbidade e mortalidade, podendo atingir diferentes espécies de animais de produção, sendo um grande problema econômico para os produtores (DAMASSA et al., 1992).

As principais espécies de *Mycoplasma* spp. responsáveis por enfermidades nos animais são: *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* em aves, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides subsp. capri* e *Mycoplasma ceratoconjunctivae* em caprinos. Na suinocultura também há uma importante enfermidade causada por micoplasmas que é a artrite e a pneumonia enzoótica suína (LAURIMAR, 2005). As micoplasmoses nos animais podem ser causadas por mais de 200 espécies pertencentes a classe *Mollicutes* (FREY, 2002). Várias espécies são descritas em ruminantes, ocasionando diferentes quadros de micoplasmoses (JUNQUEIRA e LANGONI, 2016).

Na avicultura, destaca-se a importância do *M. gallisepticum* como causador de doenças respiratórias crônicas, que coloniza o epitélio respiratório das aves com interesse econômico, levando a queda de produção, sendo um dos patógenos mais importantes na espécie (PAPAZISI et al., 2003).

Na suinocultura, *M. hyopneumoniae* causa a pneumonia enzoótica dos suínos, com prevalência muito importante, agravando ainda mais os danos a cadeia produtiva, além do aumento a susceptibilidade a outras doenças por afetar o sistema imune dos animais (CHAE, 2016).

Na bovinocultura as micoplasmoses estão associadas a importantes enfermidades reprodutivas, como as endometrites; respiratórias, como as pneumonias, além de doenças associadas as articulações, otites e ainda inflamações da conjuntiva ocular. Destaca-se, entretanto, as mastites causadas por diferentes bactérias do gênero, pois são altamente contagiosas e, pelo grau de exigência possuem diagnóstico mais complexo (KIRBY e NICHOLAS, 1996; PFÜTZNER e SACHSE, 1996). São várias as espécies que podem causar mastites, como *Mycoplasma alkalenses*, *M. arginini*, *M. bovis genitalium*, *M.*

bovirhinis, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. dispar* e *M. bovis* (GONZÁLEZ e WILSON 2003; MANZI et al., 2018; SALINA et al., 2019).

M. mycoides subesp. *mycoides* causa uma doença contagiosa severa em bovinos, a pleuropneumonia. Causa importantes perdas econômicas e morte dos animais (DI TEODORO et al., 2018). *M. dispar* e *M. bovirhinis* estão relacionados com casos de broncopneumonia em bezerros (FREY, 2002; ANGEN et al, 2009).

2.3.2 Mastite bovina por micoplasmas

O primeiro relato de mastite bovina causada por *Mycoplasma agalactiae* subesp. *bovis* foi feito por Hale et al. em 1962 e, posteriormente, por Aska e Erno em 1976 que renomearam o agente como *Mycoplasma bovis*.

No Brasil, há poucos relatos de mastite por *Mycoplasma* spp. O primeiro relato foi feito por Mettifogo et al. em 1996. Mais tarde, em 2013, Mettifogo e Tamaso (2013) realizaram estudos em rebanhos leiteiros no Paraná e Minas Gerais e constataram a presença de surtos da doença. Pretto et al. (2001) relataram uma baixa prevalência (1,12%) de casos positivos em vacas leiteira no estado de São Paulo e do Paraná.

Não há dados no Brasil de casos de mastite causados por outras espécies de *Mycoplasma* spp, além de *Mycoplasma bovis*. Entretanto, como alegado por Manzi et al. (2018), em função dos seus respectivos resultados que revelaram baixa prevalência de *Mycoplasma bovis*, essa baixa prevalência poderia ocorrer em função de outras espécies de micoplasmas responsáveis por mastite positivas para a classe *Mollicutes*. Todavia, a espécie *Mycoplasma bovis* ainda é considerada a mais importante como agente de mastite bovina, pela sua elevada patogenicidade (BUSHNELL, 1984; GRAND et al., 1997).

A mastite causada por espécies de *Mycoplasma* spp. pode ser clínica ou subclínica, geralmente persistindo no teto, levando a uma mastite crônica, sendo comumente observados surtos da doença nas propriedades leiteiras (BRAMLEY, 1992). Ela possui um caráter altamente contagioso, pois, no momento da ordenha, as mãos do funcionário e a ordenadeira podem ser contaminadas com o agente, tornando-se vias de transmissão para outros animais (GONZALEZ e WILSON, 2003)

Segundo Pretto et al. (2001), além das alterações físico-químicas observadas no leite de vacas com mastite causadas por espécies de *Mycoplasma* spp., sinais incomuns ocasionados por outros agentes, como a agalaxia, pode ocorrer. Além de sinais sistêmicos, no sistema ósteo-articular, como claudicação em função de artrites, e alterações do apetite (WILSON et al., 2007).

Rebanhos livres de micoplasmoses, geralmente, adquirem o patógeno a partir da introdução de novos animais no rebanho sem previa quarentena e exames diagnósticos para enfermidades contagiosas (GOURLAY et al., 1989). Portanto, o melhor método de controle é o descarte dos animais positivos, paralelo ao uso de medidas preventivas para mastite contagiosa e controle rigoroso na introdução de novos animais no rebanho, com exames específicos para a detecção deste patógeno (GUNNING e SHEPHERD 1996; LANGONI et al., 2017 LOPES et al., 2018).

A mastite causada por espécies de micoplasma pode ocorrer por via ascendente, via canal do teto ou também sistêmica, tendo como porta de entrada as vias respiratórias a partir da inalação do agente, ou também pelo trato genital, nesse caso principalmente pela utilização de fômites contaminados (FOX et al., 2005).

A maior preocupação motivada pelas mastites contagiosas causadas pelos agentes das espécies de micoplasma se deve aos sinais clínicos que podem ocorrer como febre, edema e endurecimento do úbere com alterações macroscópicas do leite (HIGUCHI et al., 2013). Além disso, há a preocupação devido à alta contagiosidade do agente comparada, por exemplo, aos *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., patógenos com grande importância e muito estudados na mastite bovina no mundo. Outra característica que afeta diretamente a cadeia produtiva é a resposta refrataria dos micoplasmas aos antimicrobianos utilizados na rotina das propriedades rurais, dificultando ainda mais seu controle e erradicação (NICHOLAS et al., 2016).

A principal espécie, da classe *Mollicutes*, envolvida nos casos de mastites no mundo é o *Mycoplasma bovis*, mas têm-se relatos de mais de 25 espécies, entre elas, as mais frequentes são: *M. californicum*, *M. arginini*, *M. bovirhinalium*, *M. alkalescens*, *M. canadense*, *M. díspar* e *M. bovirhinis*,

podendo haver diferenças dependendo da região do estudo (NICHOLAS e AYLING, 2003; HIGUCHI et al., 2013).

Geralmente, a mastite causada por bactérias da classe *Mollicutes*, ocorrem em surtos isolados, e, com frequência, tem histórico de introdução recente de animais no rebanho, porém, no Brasil, há poucos estudos buscando mapear a ocorrência do agente no território nacional (LANGONI, 2013).

Nos Estado Unidos e em regiões da Europa é comum o relato de surtos em propriedades e, associados aos casos de mastite também aparecem quadros respiratórios nos animais, principalmente em bezerros, uma vez que o agente tem tropismo importante para as vias aéreas. Outra característica relevante é que esses quadros clínicos aparecem com maior frequência em propriedades com grandes rebanhos (POTHMANN et al., 2015)

Os relatos de casos podem ser subestimados no Brasil e também no mundo devido à dificuldade de diagnóstico, decorrentes das características específicas de cultivo exigidas pelo agente, como condições de microaerofilia, meios de cultura e, mesmo tomando todas as medidas adequadas de cultivo, é importante que o material contenha o mínimo de células viáveis para possibilitar o isolamento do micro-organismo (MANZI, 2014).

No cultivo microbiológico não é possível distinguir a espécie do agente, apenas pela visualização macroscópica das colônias e não há testes bioquímicos que podem ser utilizados. O que torna sua diferenciação ainda mais complexa é a ocorrência de coinfeção por mais de uma espécie de micoplasma, considerando-se que, em cerca de 50% das vacas positivas a infecção é causada por mais de uma espécie da classe *Mollicutes* (AL-FARTHA et al., 2017).

2.4 Prevenção e controle

Devido aos problemas e riscos associados a introdução do agente em rebanhos leiteiros, torna-se imprescindível o monitoramento e o controle do patógeno nas propriedades, enfatizando-se a dificuldade de êxito de tratamento pelas características inerentes ao agente. Geralmente, amostras de leite contaminado por esses agentes tem resultado negativo de cultivo

microbiológico convencional (PHILPOT & NICKERSON, 2002). Porém, segundo Punyapornwithaya (2009), a centrifugação e posterior ressuspensão do leite das amostras aumenta em quatro vezes a chance de resultados positivos na técnica de PCR para espécies de *Mycoplasma* spp.

Considerando as características do agente e os prejuízos associados à sua introdução no rebanho, a técnica de PCR pode ser utilizada para o monitoramento da sanidade do rebanho e qualidade do leite, principalmente em propriedades com grandes rebanhos em lactação (TRONCARELLI et al., 2015), uma vez que o método permite a pesquisa de várias espécies, utilizando-se *primers* específicos. Além disso, trata-se de uma técnica de fácil execução e de resultados rápidos comparados ao cultivo microbiológico especificamente para a classe *Mollicutes* que exige condições especiais para o isolamento. (HIGUCHI et al., 2013).

O ponto mais importante para prevenir e controlar as mastites é o diagnóstico, sendo assim, a implementação de protocolos e procedimentos de boas práticas que visem evitar a disseminação da doença no rebanho, bem como o treinamento dos ordenhadores e demais funcionários que mantenham contato direto com os animais durante o manejo diário e ordenha. E, quando detectado um animal positivo, principalmente no caso das micoplasmoses, este deve ser separado dos demais e seu leite descartado, não devendo ser utilizado para nenhuma finalidade (RUEGG, 2000; AIRES, 2010).

3 HIPÓTESES DO ESTUDO

Diante do exposto, propôs-se o presente estudo no sentido de avaliar a participação de diferentes espécies de micoplasmas na etiologia das mastites clínicas bovinas, bem como de tanques de expansão, das propriedades com casos positivos de mastites para a classe *Mollicutes*.

- Espera-se identificar, casos de mastite clínica causados por espécies da classe *Mollicutes*.
- Os casos de mastite com PCR positivos para a classe *Mollicutes* e negativos para *Mycoplasma bovis*, possam ser identificados como pertencentes a outras espécies da mesma classe.

- Espera-se encontrar menor frequência de *M. bovis* comparado com as outras espécies analisadas.
- Identificar bactérias do gênero *Mycoplasma* em amostras de leite provenientes de vacas com mastite clínica, que foram negativas no cultivo microbiológico convencional.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Detectar casos de mastite clínica causadas por bactérias da classe *Mollicutes* por meio de análises moleculares, pela a técnica de PCR, e identificar, em cada caso, a espécie envolvida.

4.2 Específicos

- Investigar a presença das bactérias do gênero *Mollicutes* em tanques de expansão de leite bovino por meio da técnica de PCR, em propriedades com diagnósticos de micoplasmoses mamária.
- Identificar espécies do gênero *Mollicutes* em casos clínicos de mastite e no leite de tanques de expansão.
- Comparar os resultados da detecção de mastites causadas por bactérias da classe *Mollicutes* a partir da centrifugação prévia das amostras com a extração de material genético diretamente das amostras de leite.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Comissão de Ética no Uso de Animais

O presente trabalho foi aprovado na Comissão de Ética da FMVZ-Unesp Botucatu, sob o protocolo 0136/2017 (Anexo 1).

5.2 Propriedades rurais

As amostras de leite foram obtidas, por conveniência de propriedades leiteiras localizadas em municípios de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, enviadas ao Núcleo de Pesquisas em Mastite para diagnóstico microbiológico das mastites dos rebanhos bovinos

Foram avaliadas também amostras de leite de tanques de expansão, provenientes de coletas quinzenais de dez diferentes propriedades. Os rebanhos dessas propriedades possuem, em comum, programas de controle de mastite (com registros de dados em softwares de gerenciamento), contagem de células somáticas (CCS) ≤ 400.000 cs/mL (valor adotado para celularidade de vacas pela IN 76/2018), raça holandesa de alta produção (>20 litros/vaca/dia), possuem no mínimo de 200 vacas em lactação, em regime de ordenha mecânica. Trata-se de amostras de conveniência, analisadas para pesquisa de outros patógenos de acordo com os objetivos do projeto temático subvencionado pela FAPESP processo nº 2015/19688-8.

5.3 Colheita de leite

O teste de Tamis (caneca preta) foi utilizado para o diagnóstico de casos de mastite clínica, sendo coletado cujas glândulas mamárias apresentaram alterações do leite visíveis, bem como sinais clínicos sistêmicos de inflamação nas mamas como edema, calor, dor e rubor e, ocasionalmente, sinais sistêmicos.

Foram colhidas também amostras quinzenais de tanques de expansão de todas as propriedades em frascos estéreis como método de triagem, visando estimar a ocorrência de infecções pelo agente em vacas em lactação nos rebanhos.

Amostras com ao redor de 15 ml de leite dos quartos com mastite clínica foram colhidas assepticamente e mantidas congeladas (-20°C) nas propriedades até o envio ao Núcleo de Pesquisas em Mastites – NUPEMAS FMVZ Unesp Botucatu, em temperatura de refrigeração (4 a 8°C), para posterior submissão a técnicas diagnósticas.

5.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

5.4.1 Concentração das amostras

As amostras foram homogeneizadas, e uma alíquota de 1mL foi utilizada para extração do DNA. O volume remanescente, foi centrifugado a 5000g por 30min, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1mL de PBS pH 7,2, posteriormente a amostra foi identificada para extração do DNA (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2009).

5.4.2 Extração DNA

A extração do DNA foi procedida seguindo o método de fervura descrito por Fan et al. (1995), com modificações padronizadas no NUPEMAS. As amostras foram centrifugadas a 12000rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 500 microlitros de PBS pH 7,2 homogeneizando-se em vórtex. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante, adicionando-se 50 microlitros de tampão de eluição. As amostras passaram pelo processo de fervura por 10 minutos e choque em banho de resfriamento por 5 minutos quando novamente foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm, sendo o sobrenadante o produto final extraído.

5.4.3 Caracterização molecular de bactérias do gênero *Mollicutes*

Inicialmente foi realizada a reação de PCR para detecção da classe *Mollicutes*, utilizando-se os *primers* MGSO (5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC 3') e GPO-3 (5' GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC 3'), visando identificar produto de 270 pares de base, utilizando o controle positivo ATTCC 25523 (VAN KUPPEVELD et al., 1992).

5.4.4 Espécies de *Mycoplasma* spp.

Uma vez positivas para a PCR com *primers* genéricos, foi realizada à amplificação do DNA utilizando-se *primers* específicos, apresentados no Quadro 1, para *M. bovis*, *M. alkalescens*, *M. californicum*, *M. bovigenitalium* e *M. bovirhinis*, de acordo com os ciclos apresentados no

Quadro 2 (BOONYAYATRA, 2012).

Quadro 1. *Primers* utilizados para a pesquisa de diferentes espécies de micoplasma em amostras de leite de vacas com mastite clínica e amostras de tanque de expansão.

Espécie	Primers	Nº de pares de bases
<i>M bovis</i>	CCGTCAAGGTAGCATCATTTTC CTAT CCTTTTAGATTGGGATAGCGGATG	360
<i>M alkalescens</i>	GTCGTTATAGGGAAAGAAAACCT AGAGTCCTCGACATGACTCG	704
<i>M californicum</i>	GCACTTAGACGAAAGAGGGATT GGATTATCATCACCTTTGGGACT	280
<i>M bovigenitalium</i>	CGTAGATGCCGCATGGCATTTCACGG CATTCAATATAGTGGCATTTCCTAC	312
<i>M bovirhinis</i>	GTCGATAGAGAGGTCTATCG ATTACTCGGGCAGTCTCC	316

Fonte: Organizado pelo autor

A seguir são apresentados os ciclos utilizados para extração da material genômico de acordo com as espécies de *Mycoplasmas* spp.

Quadro 2. Perfil de ciclagem utilizados no termociclador para realização da reação de PCR por espécie de micoplasmas.

Espécie de <i>Mycoplasma</i>	Perfil ciclagem
<i>M. bovis genitalium</i>, <i>M. alkalescens</i>, <i>M. bovis hinis</i>	94°C/9min; 35 ciclos de 94°C/30min, 60°C/1min, 72°C/1min; 72°C/7min
<i>M. californicum</i>	95°C/15min; 45 ciclos de 94°C/15s, 60°C/1min, 72°C/30seg; 72°C/5min
<i>M. bovis</i>	94°C/3min; 35 ciclos de 94°C/1min, 60°C/1min, 72°C/1min; 72°C/30min

Fonte: Organizado pelo autor

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese horizontal (Major ME-20 Horizontal Electrophoresis System) em gel de agarose 1,5% em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Nancy 520 (TM Sigma Life Science). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA 100 pares de bases, sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Gel Doc- It – Imaging System (UVP) – DNA Analyser).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de leite, dos casos de mastite clínica, cultivadas para a pesquisa de micro-organismos aeróbios causadores de mastite foram negativas nos meios de ágar sangue e ágar MacConkey, resultados obtidos na pesquisa do projeto temático subvencionado pela FAPESP, processo: 2015/19688-8.

Foram realizadas PCR em 993 amostras de leite, e em 70 amostras de tanques de expansão das mesmas propriedades utilizando-se os *primers* genéricos para a classe *Mollicutes*, como descritos no item 5.4.3.

Do total de amostras de mastite clínica, onde se realizou a concentração, 136 (13,69%) foram positivas após submetidas a técnica de PCR com os *primers* genéricos, para a classe *Mollicutes*. Posteriormente, essas amostras, foram submetidas a PCR com *primers* específicos para as

outras espécies de *Mycoplasma* spp, com primers para identificação de *M. alkalescens*, *M. bovigenitalium*, *M. bovirhinis*, *M. californicum* e *M. bovis*, sendo que os resultados obtidos foram negativos.

As amostras concentradas oriundas dos tanques de expansão, testadas para os *primers* genéricos da classe *Mollicutes*, também foram negativas, como ilustrado na *Figura 1*. Para as amostras de tanques de expansão negativas não foram testados os primers específicos para as demais espécies pesquisadas no estudo, uma vez que, era pré-requisito serem positivas para classe antes do teste para as espécies.



Figura 1. Amostras de leite de tanques de expansão negativas

As amostras de leite de casos de mastite clínica com resultado positivo para a classe *Mollicutes* foram submetidas a nova extração, sem prévia concentração a fim de se comparar com os resultados obtidos com a concentração das amostras. Das 136 (13,69%) amostras positivas para *Mollicutes* detectadas pela técnica de PCR convencional, e apenas 80 (8,05%) foram positivas sem o método de concentração por centrifugação prévia a extração de DNA, como exemplificado na *Figura 2*, salienta-se que, 5,64% das amostras teriam resultado falso negativo pelo método convencional de obtenção do material extraído, ou seja, caso seja realizado um monitoramento profilático em uma propriedade, a fim de detectar mastites causadas por micoplasmas, sem o uso da concentração há grandes possibilidades dos resultados obtidos serão subestimados, o que sugere em trabalho futuros a

realização da concentração das amostras de leite para melhorar a sensibilidade da técnica.

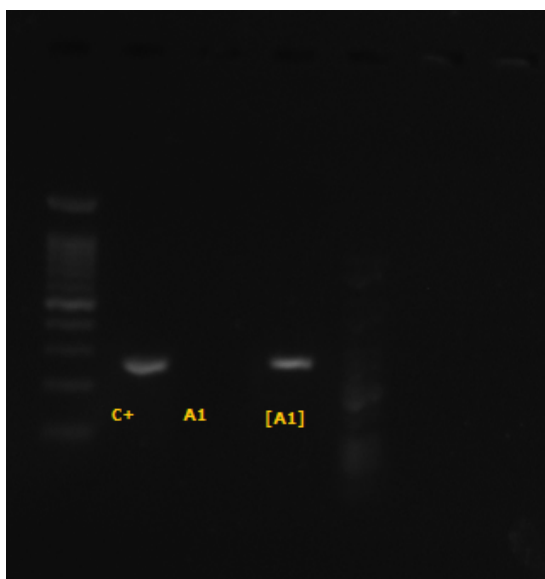


Figura 2. Resultado para mesma amostra, positiva para *Mollicutes* quando previamente concentrada, e negativa quando o material genético foi extraído diretamente do leite somente homogeneizado.

Com relação aos resultados negativos obtidos com as amostras de leite dos tanques de expansão, a baixa concentração do agente em uma amostra do tanque representa uma grande limitação para detecção de organismos do gênero *Mollicutes*. De acordo com González e Wilson (2003), de 30 a 40% das amostras provenientes de tanques de expansão positivas para micoplasmas obtêm-se resultado negativo, indicando, desta forma, que uma propriedade pode ser considerada livre do agente erroneamente. Isso se dá devido ao leite das vacas infectadas estar diluído no tanque em um grande volume de leite, dessa forma a mistura do leite de tetos positivos para o agente, com leite de vacas saudáveis, resulta-se em uma concentração abaixo do nível mínimo de detecção (BIDDLE e COWORKERS, 2003) e também pelo fato do leite de vacas com mastite clínica ser descartado, assim sendo, os resultados obtidos podem ser subestimados, levando a uma interpretação equivocada de propriedades livres do agente (MANSEULL et al, 2011).

Também é necessário considerar a eliminação intermitente do agente no leite, o que pode ocasionar um resultado falso negativo na coleta de uma

primeira amostra de leite do tanque sugere-se a realização de novas coletas seriadas, para se obter um resultado mais, o que está de acordo com Francoz (2012) que obteve resultados positivos em coletas de tanques de expansão em um mês e, no mês subsequente, os resultados foram negativos. O ideal seria a coleta de amostras de leite de tanques semanal durante três semanas para o monitoramento da qualidade do leite, do ponto de vista microbiológico, especialmente no caso de micoplasmas.

A *Figura 3* demonstra os resultados positivos nas amostras de leite de vacas com mastite clínica comparando a análise utilizando a concentração da amostra por centrifugação, com a amostra apenas homogeneizada. A coluna laranja utilizando concentração do leite (série 1) e a coluna azul, a alíquota direta do leite apenas homogeneizada (série 2). A coluna cinza (série 3) evidencia os animais considerados negativos utilizando o método convencional, ou seja, 5,6% dos animais, considerados negativos, seriam mantidos no rebanho favorecendo a disseminação da doença e acarretando em perdas significativas de lucros para os proprietários.

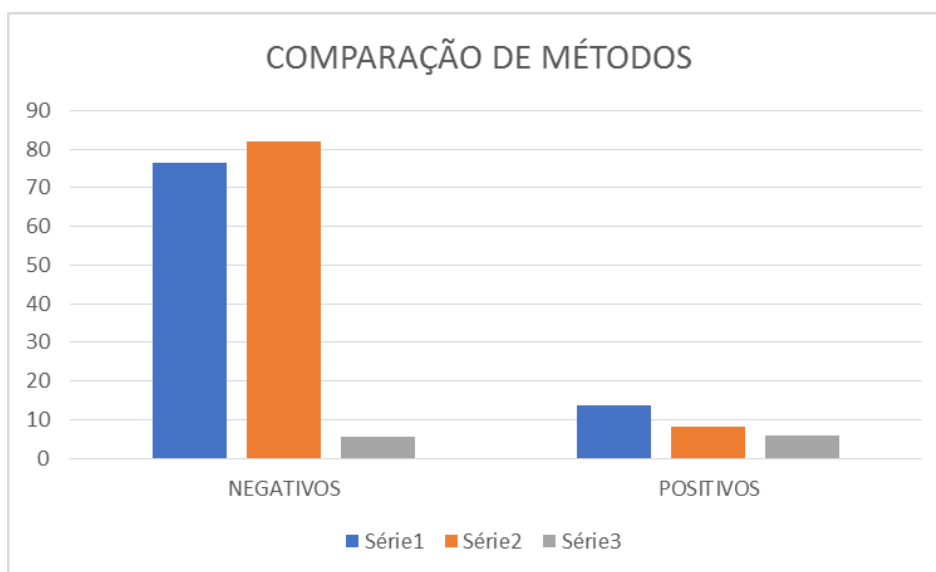


Figura 3. Comparação de resultados positivos e negativos utilizando o método de concentração de amostras por centrifugação (série 1) e a extração direta do leite homogeneizado (série 2).

Segundo Punyapornwithaya (2009) a habilidade de detecção de pequenas concentrações do agente no leite pode ser incrementada em até 4 vezes quando comparada a pesquisa sem sedimentação do agente na amostra

e subsequente ressuspensão, o que explica a maior positividade com a concentração do agente, na comparação de métodos.

Portanto, observa-se a importância do método no diagnóstico da mastite causada por bactérias do gênero *Mollicutes*, pela possível baixa concentração do agente no leite, levando a resultados falsos negativos, o que, conseqüentemente, mantém animais positivos no rebanho, favorecendo a disseminação dos casos de mastites pelo agente, além de aumentar as perdas econômicas da propriedade podendo inviabilizar a atividade. Para um adequado programa de monitoramento para eliminação de patógenos de alta contagiosidade como *Mycoplasma* spp., é necessário a utilização de uma metodologia com técnica de elevada sensibilidade para que se obtenha resultado fidedigno.

A Figura 4 mostra os resultados positivos obtidos em trabalhos realizados no Brasil com a identificação de micoplasmas causando mastite clínica em vacas. Junqueira (representado pelo número 3), em 2017, encontrou 3,03% de vacas com mastite causadas por micoplasmas em propriedades de Goiás, São Paulo e Minas Gerais. Manzi (representado pelo número 1), em 2018, encontrou 16,4% de vacas com mastite clínica por micoplasmas em propriedades da região de Botucatu e, Salina (representado pelo número 4), em 2018, encontrou positividade em 8,57% das vacas avaliadas em seu estudo. O número 2 representa os resultados encontrados no presente estudo.

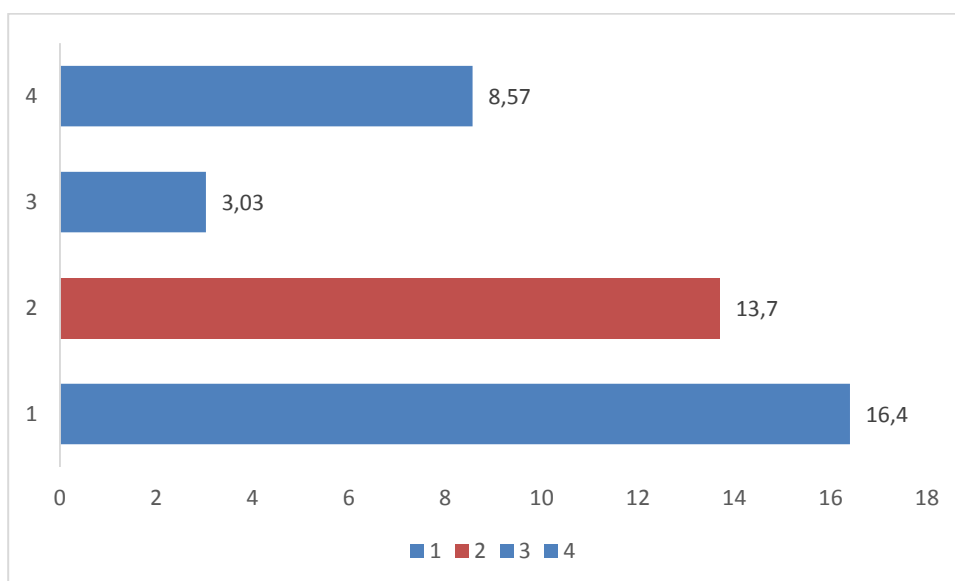


Figura 4. Comparação de resultados positivos para a classe *Mollicutes* causando mastite clínica em vacas de propriedades leiteiras no Brasil.

Desta forma, pode-se observar uma diferença na porcentagem de positividade, o que poderia ser explicado pela utilização do método de concentração evidenciando um aumento de positividade após a concentração das amostras, previamente a extração de DNA. Exceto no estudo de Manzi et al, realizado em 2018, que revelou uma maior positividade (16,4%) para a classe *Mollicutes*. Tal fato, poderia ser explicado pela época do ano de obtenção de amostras e também pelo tamanho e composição do rebanho.

Estudos realizados nos EUA revelaram positividade de 1 a 8% (FOX, 2003), na Grécia de 5,4% (FILIOUSSIS, 2007), na Tailândia de 1,8% (KAMPA, 2009) e França de 0,5% (GOURLAY, 1974). Estes resultados evidenciam a baixa ocorrência do agente observada nos rebanhos mundialmente, fato que, sugere a importância introdução do método de concentração do leite como protocolo para pesquisas de bactérias do gênero *Mollicutes*, pois, a baixa ocorrência do agente como responsável por casos de mastite nos rebanhos no mundo pode ser o resultado de sua baixa e intermitente eliminação no leite, subestimando a ocorrência desse patógeno, possibilitando ainda a disseminação nas propriedades leiteiras.

Deve-se considerar ainda que a metodologia de extração de DNA e PCR convencionais tem sensibilidade de detecção de cerca de 400 células de micoplasmas/ml, ou seja, amostras com concentrações menores, possivelmente, resultarão negativas utilizando-se a metodologia convencional (BUZINHANI, 2007), destacando-se a importância de métodos de concentração do patógeno.

O método também é importante para pesquisas do agente no cultivo microbiológico (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2009) e pode trazer grandes ganhos e possibilitar o sequenciamento genético para diferenciação das espécies envolvidas e elucidar os casos em que a determinação do agente fica restrito a classe ou ao gênero apenas. Pode ser mais trabalhoso, mas o importante é que pode melhorar a sensibilidade diagnóstica.

Estudos no Sul da Austrália apresentaram 76,7% de amostras positivas para *Mycoplasma* spp. e *Acholeplasma. laidlawii*, sendo a coinfeção encontrada em 52,1% das amostras (FARHA et al, 2017). Estes dados trazem uma possível explicação para os resultados positivos encontrados para a classe *Mollicutes* e resultados negativos para as espécies pesquisadas. Uma

vez que, no Brasil, não havia estudos anteriores para detecção de espécies específicas de *Mycoplasma* spp. causando mastite além de *M. bovis*, pode-se sugerir outras espécies envolvidas ou, até mesmo, a coinfeção por várias espécies dificultaria determinação da espécie envolvida em cada caso.

Hirose et al; (2001) encontraram aproximadamente 70% de positividade para a classe *Mollicutes* em amostras de leite de vacas com mastite, utilizando a PCR convencional, assim como Justice- Allen et al (2011), nos EUA, usando PCR em tempo real comparando com a cultura, encontrou resultado semelhante. Analisando os dados apresentados e, considerando a importância e contágiosidade do agente, reforça-se ainda mais o risco, para o rebanho e para a produção, de um animal positivo, não identificado, servindo com fonte de infecção. Em pouco tempo, pode-se ter um rebanho, aparentemente livre do patógeno, entretanto, com positividade semelhante ou até mais elevada que a encontrada pelos autores citados.

Em relação as espécies de micoplasma, no estudo de Hirose et al (2001), cerca de 70% das amostras positivas, eram para a espécie *M. bovirhinis*, não concordando o que obteve-se no presente estudo, o que poderia ser explicado pelo local em que o estudo foi conduzido, assim como Justice-Allen et al (2011) que encontraram, pelo sequenciamento do amplicon, *M. bovigenitalium* causando mastite. A não concordância com os resultados encontrados na literatura pode ser devido as espécies mais importantes na etiologia das mastites no Brasil ser diferentes de outros países, uma vez que não há estudos similares aqui, tornando imprescindível para a saúde dos rebanhos brasileiros a busca e identificação destas espécies, uma vez que sendo diferentes, requerem uma outra abordagem de manejo e controle. É provável que exista uma maior quantidade de animais e rebanhos contaminados com o agente, sem que ao menos se saiba a espécie de micoplasma envolvida. Há diversas espécies de micoplasma causando outras enfermidades rebanhos nos bovinos, e, possivelmente, alguma delas, não associada a mastite possa ter maior importância n no Brasil.

7 CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados, obtidos para bactérias da classe *Mollicutes*, observa-se a importância dessa classe de micro-organismo nos casos de mastite em grandes rebanhos leiteiros de alta produção no Brasil.
- O uso da técnica de concentração de amostras de leite, previamente à extração de DNA, por centrifugação, sugere que a prevalência de espécies de micoplasma envolvidas na mastite clínica possa estar sendo subestimada nos rebanhos leiteiros do Brasil, pelo número elevado de resultados falsos negativos.
- Os resultados negativos utilizando-se os *primers* avaliados, sugere que outras espécies da classe *Mollicutes* estejam envolvidas na etiologia das mastites, nas amostras de leite avaliadas.
- O monitoramento do leite de tanques de expansão é de extrema importância, pois a eliminação de micoplasmas pelo leite é considerada intermitente, devendo ser realizada, periodicamente, a pesquisa desses patógenos nas propriedades, como atividade de vigilância para a detecção, o mais precoce possível e tomada de medidas de controle, evitando-se a disseminação do micro-organismo nos rebanhos.

REFERÊNCIAS

- AIRES T.A.C.P. Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. *Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa*, 2010
- ALVES, A.C.; CAPRA, E.; MORANDI, S.; CREMONESI, P.; PANTOJA, J.C.F.; LANGONI, H.; DE VARGAS, A.P.C.; DA COSTA, M.M.; JAGIELSKI, T.; BOLAÑOS, C.A.D.; GUERRA, S.T.; RIBEIRO, M.G. *In vitro* algicidal effect of guanidine on *Prototheca zopfii* genotype 2 strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis. *Letters in applied microbiology*, v. 64, p. 419-423, 2017.
- ANGEN, O.; THOMSEN, J.; LARSEN, L.E.; LARSEN, J.; KOKOTOVIC, B.; HEEGAARD, P. M.; ENEMARK, J. M. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol.*, v.137, n.1-2, p.165-71, 2009.
- BAGLEY, C. V.; HARDING, R.. Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 230, n. 10, p 1519-23, 2007.
- BAR, D.; TAUER, L.; BENNETT, G.; GONZÁLES, R.; HERTL, J.; SCHUKKEN, Y. H.; SCHULTE, H.; WELCOME, F. L.; GRÖHN, Y. The cost of generalised clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *The Journal of Dairy Science*, v.91, n.6, p. 2205-2214, 2008
- BENNET R.H.; JASPER D.E. Immunosuppression of humoral and cell mediated responses in calves associated with inoculation of *Mycoplasma bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 38:1731-1738. 1977.
- BOONYAYATRA S.; FOX L.; BESSER T.; SAWANT A.; GAY J.; RAVIV Z. A PCR assay and PCR – restriction fragment length polymorphism combination identifyin the 3 primary *Mycoplasma* species causing mastitis *J. Dairy Sci.* 95: 196 – 205, 2012.

BRADLEY, A. J. Bovine Mastitis : An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, p. 116–128, 2002.

BRADLEY, A. J.; LEACH, K. A.; BREEN, J. E.; GREEN, L. E.; GREEN, M. J. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *The Veterinary Record*, v. 160, n. July 2014, p. 253–258, 2007.

BRASIL – Ministério da Agricultura MAPA. Instrução Normativa IN 77 Publicado em: 30/11/2018 | EDIÇÃO: 230 | SEÇÃO: 1 | PÁGINA: 10, 2018

BRASIL - Ministério da Saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira. 2ª edição 1ª reimpressão Brasília — DF 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf, 2014

BRESSAN, M. Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite. Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 65p. 2000.

BUSHNELL, R. B. Mycoplasma mastitis. Symposium on mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice*, v. 6, n. 2, p. 301-12, 198
cattle: To cull or not to cull. *Vet J.*, v.216, p.142-147, 2016.

CHAE, C. Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and Mycoplasma hyopneumoniae. *Vet J.*, v. 212, p. 1-6, 2016.

COSTA, E. O.; GARINO JUNIOR, F.; PADOVESE, L.; SANTOS, E. Avaliação da eficácia de tratamentos de mastite clínica em vacas em lactação. Rev. Núcleo Pesq. Glând. Mam. *Prod. Leiteira*, n. 1, p. 3-9, 2003.

DALANEZI, F. M.; PAZ, G. S.; JOAQUIM, S. F.; GUIMARAES, F. F.; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H.. Short communication: The first report of *Cyberlindnera rhodanensis* associated with clinical bovine mastitis. *J D SCI*, v. 101, p. 581-583, 2018

DAMASSA, AI J.; WAKENELL, P.S.; BROOKS, D.L. Mycoplasmas of goats and sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v.4, n.1, p.101-113, 1992.

DE FREITAS GUIMARÃES, F.; NÓBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; DE FIGUEIREDO PANTOJA, J. C.; LANGONI, H. Enterotoxin

genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 5, p. 2866-2872, 2013.

DI TEODORO, G.; MARRUCHELLA, G.; DI PROVVIDO, A.; ORSINI, G.; RONCHI, G. F.; D'ANGELO, A. R.; D'ALTERIO, N.; SACCHINI, F.; SCACCHIA, M. Respiratory explants as a model to investigate early events of contagious bovine pleuropneumonia infection. *Vet Res.*, v.49, n.1, p.5, 2018.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anoario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro.>, 2018

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FAN, H.H.; KLEVEN, S.H.; JACKWOOD, M.W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian. Dis.*, v.39, p.729-735, 1995.

FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) FAO PUBLICATIONS CATALOGUE 2018 Disponível em: <http://www.fao.org/3/I9004EN/i9004en.pdf>, 2018

FERREIRA, G. A.; GUIRRO, E. C. B. P.; BLAGITZ, M. G.; LIBERA, A. M. M. P. D. Estratégias de prevenção da mastite bovina no período de transição. *Veterinária em Foco; Canoas*; v.12; n.2, p. 80-91, 2015.

FERREIRA, J. L. LINS, J. L. F. H., CAVALCANTE, T. V., DE MACEDO, N. A., BORJAS, A. D. L. R. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. *Ciência Animal Brasileira*, v. 8, n. 2, p. 261-266, 2007.

FILIOUSSIS, G.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; THATCHER, A.; PETRIDOU, V.; BOURTZI-CHATZOPOULOU E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. *The Veterinary Journal*, v. 173, p. 215-218, 2007.

FOX, L. K.; GAY, J. M. CONTAGIOUS MASTITIS. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 9, n. 3, p. 475–487, 1993.

- FOX, L. K.; KIRK, J. H.; BRITTEN, A. Mycoplasma Mastitis: A Review of and Control. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 52, p. 153-160, 2005,.
- FRANCOZ, D.; BERGERON, L.; NADEAU, M.; BEAUCHAMP, G. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Québec. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 53, n. 10, p. 1071,
- FREY, J. Mycoplasmas of animals. In: *Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas* (pp. 73-90). Springer, Boston, MA, 2002.
- GONDAIRA, S.; HIGUCHI, H.; NISHI, K.; IWANO, H.; NAGAHATA, H. Mycoplasma bovis escapes bovine neutrophil extracellular traps. *Veterinary Microbiology*. v.199, p.68-73, 2017.
- GONZÁLEZ R.N. & WILSON D.J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet. Clin. N. Am., Food Anim. Pract.* 19(1):199-221. [http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(02\)00076-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(02)00076-2). 2003
- GOURLAY R.N., STOTT E.J., ESPINASSE J. & BARLE C. Isolation of Mycoplasma agalactiae var. bovis and infectious bovine rhinotracheitis virus from outbreak of mastitis in France. *Vet. Rec.* 95:534-535, 1974
- GRAND, D.; POUMARAT, F.; BEZILLE, P. Mycoplasmoses bovines à *Mycoplasma bovis*. *Le Point Veterinaire*, v. 28, n. 180, p. 23-30, 1997.
- GREEN, M. J.; GREEN, L. E.; MEDLEY, G. F.; SCHUKKEN, Y. H.; BRADLEY, A. J. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v.85, n.10, p.2589-2599, 2002
- GUIMARÃES F F., Nobrega D.B., Richini-Pereira V.B., Marson P.M., De Figueiredo Pantoja J.C. & Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.* 96:2866-2872, 2013
- GUNNING R.F. & SHEPHERD P.A. Outbreak of bovine Mycoplasma bovis mastitis. *Vet. Rec.* 139:23-24, 1996
- HALE, H. H., HELMBOLTD, C.F., PLASTRIDGE, W. N., STULA, E. F. Bovine mastitis caused by a mycoplasma species. *Cornell. Vet.*, n., p. 534-535, 1962.

HARMON R.J. Somatic cell counts: myths vs reality. Proc. 37th National Mastitis Council Regional Meeting, Bellevue, Madison, p.40-50, 1998

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

HIROSE, K., KAWASAKI, Y.K., KOTANI, K., TANAKA, A., ABIKO, K., OGAWA, H.. Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. *Journal of Veterinary Medicine Science*. 63(6):691–693, 2001.

HOGVEEN, H; HUIJPS, K; LAM, T. J. G. M. Economic aspects of mastitis : New developments Economic aspects of mastitis : New developments. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 59, n. June 2014, p. 16–23, 2011.

HOUSE, J.; SHEEHY, P.; BOSWARD, K.; GUNN, A. Mycoplasma: a re-emerging pathogen. IN: Countdown Symposium Melbourne 27., Melbourne. Proceedings... Melbourne v.401, p.23-400, 2011.

JUNQUEIRA, N. B., OLIVEIRA G. C, SALINA A., JOAQUIM S. F., GUIMARÃES F. F., MENOZZI B. D., LANGONI H., Mastite bovina por *Mycoplasma* spp. dinâmica da infecção em propriedades de vacas leiteiras de alta produção. Brasil. In: III Simpósio de Qualidade do Leite Jaboticabal. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2016. v. 14. p. 73-74, 2016.

JUSTICE-ALLEN, A.; TRUJILLO, J.; GOODELL, G.; WILSON, D. Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. *J Dairy Sci.*, v.94, n.7, p.3411-3419, 2011.

KAMPA J., SUJOLAPONG 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. *Wetchan Sattawaphaet* 39(3):275-280, 2009

KIRBY, F. D.; NICHOLAS, R. A. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bullocks' eyes. *The Veterinary Record*, v. 138, n. 22, p. 552-552, 1996.

KIRK, J. H., MELLENBERGER, R. Mycoplasma Mastitis in dairy cows. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.16, p.541-558, 1994.

KOBAYASHI H., Hirose K., WORARACH A., PAUGTES, P., Ito N., Morozumi T., Yamamoto K. In Vitro Amplification of the 16S rRNA Genes from *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. National Institute of Animal Health, Japan 1998

LAMM, C.G., MUNSON, L., THURMOND, M.C., BARR, B.C. & GEORGE, L.W. Mycoplasma otitis in California calves. *Diagn. Invest.*, 16, 397-402, 2004.

LANGONI H, SALINA A, OLIVEIRA G C, JUNQUEIRA N B, MENOZZI B D; JOAQUIM S F. Considerações sobre o tratamento das mastites *Pesq. Vet. Bras.* 37(11): 1261-1269, novembro DOI: 10.1590/S0100-736X2017001100011, 2017

LANGONI H., SILVA A.V., CABRAL K.G. & DOMINGUES P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: Flora bacteriana aeróbica. *Revta Bras. Med. Vet.* 20:204-210, 1998.

LANGONI, H Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina *Pesq. Vet. Bras.* 33(5): 620 a 626, maio 2013.

LANGONI, H.; LAURINO, F.; FACCIOLI, P. Y.; SILVA, A. V.; MENOZZI, B. D. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. *Vet. Zootec.*, v.16, n. 4, p. 708-715, 2009.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, V.; H, A. L.; Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 12, p. 1059–1065, 2011

LANGONI, H; CAMARGO DA SILVA, POLO C; TRONCARELLI, M Z; TATA, A; BELAZ, KRA; EERLIN, M N; JOAQUIM, S F; GUIMARÃES, F F; PARDO, R B; GOMES, E N. Short communication: Identification of *Corynebacterium bovis* by MALDI-mass spectrometry. *JOURNAL OF DAIRY SCIENCE*, v. 100, p. 4287-4289, 2017.

LAURIMAR, F. Vacinas e vacinações para micoplasmas. In: Ave Expo Américas 2005; FORUMINTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1, Foz do Iguaçu, PR. Anais. Foz do Iguaçu: 2005. p.32-34, 2005

LEME, T. M. S. P.; PIRES, M. F. A.; VERNEQUE, R. S.; ALVIM, M. J.; AROEIRA, L. J. M. Comportamento de vacas mestiças holandês x zebu, em pastagem de *Brachiaria decumbens* em sistema silvipastoril. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, n. 3, p. 668–675, 2005.

LOPES, B. C., Manzi, M. P., Langoni H. Etiologia das mastites: Pesquisa de micro-organismos da classe *Mollicutes*. *Vet. e Zootec. jun.*; 25(2) pg 9 -15, 2018

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SILVA, L.F.P. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. *Scientia Agrícola*, São Paulo, v.57, n.2, p.359-361, 2000.

MANZI, M.P. Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras do interior do estado de São Paulo. 2014. 47 p. Mestrado - Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP-,2014.

MANZI, M. P.; JOAQUIM, S. F.; GUIMARÃES, F. F.; BRUDER, NASCIMENTO, C. M. O.; PANTOJA, J. C. F.; LANGONI, H. Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. *Pesq Vet Bras.*, v. 38, n.4, p. 665-669, 2018.

METTIFOGO E., TAMASO E. Mastite por *Mycoplasma bovis*: Surtos em Minas Gerais levam ao Descarte de Animais Produtivos. *Qualy Milk*, São Sebastião do Paraíso. 2013.

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

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci.*, v.74, n.2, p.105-112, 2003.

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

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; KELTON, D. F.; SCHOLL, D. T. Incidence Rate of Clinical Mastitis on Canadian Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 4, p. 1366–1377, 2008

PAPAZISI, L.; GORTON, T. S.; KUTISH, G.; MARKHAM, P. F.; BROWNING, G. F.; SWARTZELL, S.; SWARTZELL, S.; MADAN, A.; MAHAIRAS, G.; GEARY, S. J. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. *Microbiology*, v. 149, n. 9, p. 2307-2316, 2003.

PFÜTZNER, H.; SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. v. 15, n. 4, p. 1477-1494, 1996.

PHILPOT, W. N., NICKERSON, S. C. Vencendo a luta contra a mastite. Editora *Milkbizz*, 2002. 192p.

PRETTO L G., ERNST E. MULLER, Júlio C. FREITAS, METTIFOGO, E, BUZINHANI, M, YAMAGUTI, M e SALVADOR R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros em rebanhos leiteiros¹ *Pesq. Vet. Bras.* 21(4): 143-145, out./dez. 2001

PUNYAPORNWITHAYA, V.; FOX, L. K.; GAY, G. M.; HANCOCK, D. D.; ALLDREDGE, J. R. The effect of centrifugation and resuspension on the recovery of *Mycoplasma* species from milk. *J Dairy Sci.*, v.92, n.9, p.4444–4447, 2009.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed: Porto Alegre, 2005.

RAZIN S.; YOGEV D.; NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* v.62, p.1094–156, 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.

RISSETI, R. M.; GUERRA, S. T.; PAULA, C. L.; ZASTEMPOWSKA, E. ; TWARUZEK, M.; LASSA, H.; PANTOJA, J. C. F.; RIBEIRO MG. Genes associados à virulência em linhagens de *Trueperella pyogenes* isoladas de

mastite clínica em bovinos e ovinos. In: *Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite-CBQL*, p 77-78 2017,

ROSENBUSCH R. F. Biology and taxonomy of the Mycoplasmas. In: Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH, editors. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames (IA): Iowa State University Press;. p. 3–11,1994

ROSENGARTEN R, CITTI C. O papel de micoplasmas ruminantes em infecção sistêmica. Em: Stipkovits L, Rosengarten R, Frey J., Eds. *Mycoplasmas de Ruminantes: Patogenicidade, Diagnóstico, Epidemiologia e Genética Molecular*. Bruxelas: Comissão Europeia; 14 – 17, 1999

RUEGG, P. L. New Perspectives in Udder Health Management. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 28, n. 2, p. 149–163, 2012;

SÁ M.E.P., CUNHA M.L.R.S., ELIAS A.O., VICTORIA C.; LANGONI H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41(5):320-326. 2004.

SACHSE K., PFUTZNER H., HOTZELI H., DEMUTH B., HELLER M. & BERTHOLD E. Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.* 12:571-580. 1993

SALINA, A.; TIMENETSKY, J. ; BARBOSA, M. S. ; AZEVEDO, C. M. ; LANGONI, H. . Detecção microbiológica e molecular de *Mycoplasma bovis* em amostras de leite oriundas de mastite clínica bovina. *PESQUISA VETERINARIA BRASILEIRA*, vol 40(2) pg 82-87; 2019.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L.F.L. Microrganismos patogênicos transmitidos pelo leite. In: *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo, p. 268-277, 2007

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary Gland Immunity and Mastitis Susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v. 7, n. 2, p. 135–146, 2002

SUNG, H.; KANG, S. H.; BAE, Y. J.; HONG, J. T.; CHUNG, Y. B.; LEE, C. K.; SONG, S. PCR-based detection of *Mycoplasma* species *The Journal of Microbiology*, v. 44, p. 42-49, 2006.

TORTORA G. J.; FUNKE B. R.; CASE C. L. Procariotos: Domínios Bacteria e Archaea Microbiologia. Porto Alegre: Artmed. v. 10, p. 319-320, 2012

TRONCARELLI, M. Z.; LANGONI, H.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; DA SILVA, R. C. Accuracy of a multiplex PCR protocol for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* detection in bulk tanks. *Veterinária e Zootecnia*, v. 22, n. 4, p. 625-633, 2015.

UNNERSTAD, H. E.; LINDBERG, A.; WALLER, K. P.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-ÖST, M.; BENGTSSON, B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology*. v.137, n.1, p.90-97, 2009.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Milk Production per Cow by Year, US, National Agricultural Statistics Service. Disponível em: https://www.nass.usda.gov/Surveys/Guide_to_NASS_Surveys/Dairy_Products/ndex.php , 2018.

VAN KUPPEVELD, F.J.M.; VAN DER LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F. et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* v.58, p.2606-2615, 1992.

WALDNER, D.N. Dry cow therapy for mastitis control. Disponível em: <http://www.dairyweb.ca/Resources/USWebDocs/DryCowTreatment.pdf> (Acesso em março/2020),2011

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastites. *Vet. Microbiol.* 16:41, 1988.

WEST, J. W. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 86, n. 6, p. 2131–2144, 2003.

WILSON, D. J.; SKIRPSTUNAS, R. T.; TRUJILLO, J. D.; CAVENDER, K. B.; pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Veterinary Record*, v. 124, p. 420-422, 1989

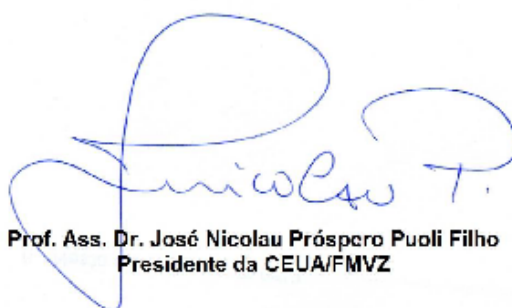
ANEXOS



A T E S T A D O

Atesto que o subprojeto intitulado "Diferenciação de espécies de *Mycoplasma* spp. isoladas de amostras de casos de mastite clínica bovina e de tanques de expansão" faz parte do Projeto "E. coli, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterococcus* spp.: Impacto dos fatores de virulência na mastite bovina e reflexos na saúde pública", **Protocolo CEUA 0136/2017**, aprovado em 08 de junho de 2017, a ser conduzido por **BRUNA CHUROCOF LOPES**, orientada pelo Prof. Dr. Helio Langoni, para fins de pesquisa científica, e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Botucatu, 30 de janeiro de 2020.



Prof. Ass. Dr. José Nicolau Próspero Puoli Filho
Presidente da CEUA/FMVZ



UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Câmpus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
☎ (14) 3880.2175 – ✉ sta@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

