

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras do interior do
estado de São Paulo.

MARCELA DE PINHO MANZI

Botucatu-SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras do interior do
estado de São Paulo.

MARCELA DE PINHO MANZI

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Nome do Autor: Marcela de Pinho Manzi

Título: Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras do interior do estado de São Paulo.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Titular Hélio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. José Carlos Figueiredo Pantoja

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP - Botucatu

Profa.Dra. Vera Mores Rall

Departamento de microbiologia

IBB – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 26 de fevereiro de 2014.

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Relação entre resultado da PCR para *M.bovis*, contagem de células somáticas do tanque e tamanho aproximado de cada rebanho (11 rebanhos que foram previamente positivos para *Mollicutes* na PCR) Botucatu-SP, 2013.....23

Tabela 2: Frequência de micro-organismos isolados em cultivo convencional a partir de amostras de leite de mastite clínica e subclínica do rebanho positivo para *M.bovis* no tanque, Botucatu-SP, 2013.....24

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Gel de agarose com 44 amostras de leite de tanque após PCR com *primers* genéricos MGSO e GPO3. (Marcador molecular de 100pb, amostras 120 a 164, controle positivo, controle negativo e marcador molecular, sendo as amostras 138 e 142 circuladas, positivas).....21

Figura 2: 11 Amostras de leite de tanque após reação de PCR para *Mycoplasma bovis*. Amostras e controles positivos. Marcador molecular de 100pb, 11 amostras (sendo a circulada a amostra positiva), dois controles positivos, controle negativo e marcador molecular.....22

Figura 3: Camp Test positivo de isolados de *Streptococcus agalactiae* obtidos de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.....24

SUMÁRIO:

Resumo.....	1
Abstract.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1.Bovinocultura leiteira.....	4
2.2.Mastite.....	4
2.3. Agentes etiológicos envolvidos na mastite.....	5
2.4.Micoplasma.....	7
3.Objetivos.....	12
4.Material e métodos.....	13
5 Resultados.....	21
6.Discussão.....	27
7.Análise estatística.....	29
8.Referências.....	30

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós
mesmos.”*

([Friedrich Nietzsche](#))

Agradecimentos:

Primeiramente, agradeço a minha família: meu pais Margarida e Ivaney por me darem desde sempre todo o amor, apoio, compreensão, exemplo e amizade. Por me mostrarem que temos que acreditar em nós mesmos e com humildade e respeito aos outros que nos cercam, buscarmos nossos sonhos, nossos objetivos. Minha irmã Ana Carolina, que com muitas conversas, brigas, risadas me faz pensar que a vida sem irmãos não deve ter tanta graça. Me orgulho muito de ter vocês como minha família! Amo vocês!

Agradeço ao professor Hélio, antes de tudo, por todas as oportunidades. No fim de 2007, mandei um e-mail lhe pedindo iniciação científica, mas ele estava nos EUA, a trabalho. Assim que voltou, no começo de 2008, me chamou para uma conversa e mesmo sem me conhecer, me deu a oportunidade de escrever um projeto de IC com ideias novas que ele trouxera do estágio sênior e assim começar minhas atividades no NUPEMAS. Desde então, deixou as portas abertas pra que eu aprendesse e crescesse profissionalmente a cada dia. Agradeço ainda pela paciência, orientação e disponibilidade em me atender e ajudar, independente do dia ou hora. Muito obrigada!

Agradeço aos meus amigos de Botucatu, que me ajudaram diretamente neste trabalho: Se não fosse a ajuda de todos vocês, Luiz e Adriana, preparando centenas de materiais, conchas e tubos, que logo de manhãzinha estavam prontos pra uso; Anelise (Ne), Ubirajara (Pensa), pela ajuda nas coletas, Sâmea (minha filha) pela força nas padronizações de meios de cultivo até tarde da noite ; Felipe (Filão) e Ariane (Ari) por me ajudarem nas intermináveis PCRs...Eesse trabalho não teria sido o mesmo sem a ajuda de vocês. Obrigada, de coração!

Agradeço ainda a todos os outros amigos, que estiveram sempre perto fisicamente ou não, fazendo dos meus dias desses dois anos de mestrado, dias melhores: Toda equipe do projeto já citada acima, Jé, Carlinha, Rodri, Gabi, Flor, Gu, Dulcinha, Fartura!! Obrigada por tudo.

Ao professor José Pantoja, que além da grande contribuição na banca de qualificação e com o delineamento estatístico, de fundamental importância pra este trabalho, acompanhou de perto minha rotina e as dificuldades técnicas encontradas no decorrer do tempo. E agora por mais uma vez, contribuir na minha banca de defesa. Muito obrigada!

Agradeço a professora Vera, pela disponibilidade em contribuir com o trabalho nesta banca de defesa, muito obrigada!

Agradeço ao professor Márcio pela grande contribuição na banca de qualificação, muito obrigada!

Agradeço a todos os produtores de leite da região, que desde o primeiro contato se mostraram interessados e disponíveis para contribuir com o trabalho e sempre foram atenciosos e prestativos, fazendo com que muitas coletas de madrugada fossem momentos agradáveis e de muito aprendizado.

Agradeço ao seu Pedro, motorista da UNESP por ter me guiado em todas as inúmeras coletas, me buscando e me trazendo no departamento, quando nem sol ainda tinha, me fazendo companhia e, muitas vezes, me ajudando nas anotações e correrias.

Agradeço por fim e com grande importância, a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa cedida durante esses dois anos, para que eu pudesse me manter em Botucatu e dar continuidade aos meus projetos profissionais (processo: 2011/16055-3) e pelo auxílio, possibilitando estruturar o laboratório de acordo com as necessidades do projeto (processo: 2011/21009-0).

1. Introdução:

O leite e seus derivados desempenham papel nutricional importante para humanos, particularmente nos primeiros anos de vida, uma vez que fornece proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais necessários ao desenvolvimento do organismo. Há, portanto, grande preocupação em assegurar a integridade e a qualidade intrínseca do leite e dos produtos lácteos destinados ao consumo humano (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). Para manter a qualidade nutricional e os padrões sanitários para o consumo do leite deve se considerar a saúde dos animais envolvidos em sua produção.

A mastite é um dos principais obstáculos enfrentados pelos criadores e indústrias lácteas, em consequência dos prejuízos econômicos que causa, tanto pela queda na produção leiteira (LANGONI et al., 2009), como na qualidade do leite produzido, no aumento do custo de tratamentos e pelo descarte precoce de vacas que apresentam mastite crônica. Em alguns países, inclusive no Brasil, as perdas chegam de 10 a 15% da produção, independente do patógeno envolvido e tipo de mastite, seja subclínica ou clínica.

Além das perdas econômicas na qualidade e produção de leite, também é importante ressaltar a importância das mastites na saúde pública, principalmente pela presença de agentes patogênicos que podem ser fatores de risco para humanos em decorrência da eliminação dos próprios patógenos ou de suas toxinas no leite (COSTA, 1998; SANTOS, 2001).

Os principais agentes contagiosos de mastite bovina são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (LANGONI et al., 1998; JAYARAO e WOLFGANG, 2003). Porém no Brasil, são poucos os estudos que abordam temas como prevalência e o impacto de micoplasmas nas mastites. Nos últimos vinte anos, os únicos estudos sobre o assunto estão restritos a surtos nos estados do Paraná (METTIFOGO et al., 1996) e Minas Gerais (METTIFOGO et al., 2013), além de um estudo de Pretto et al. (2001) também no Paraná e outro em São Paulo, relatando baixa prevalência do agente (1,12%). Dessa maneira, estudos da prevalência de micoplasmas e os reflexos desse agente como causador de mastites são

necessários, visando subsidiar pesquisadores, produtores, órgãos competentes na fiscalização da qualidade do leite e consultores.

2. Revisão da literatura:

2.1. Bovinocultura de leite no Brasil:

No Brasil a produção total de leite em 2012 alcançou 33,054 bilhões de litros (EMBRAPA, 2012). Apesar da crescente produção, o perfil da bovinocultura de leite mudou em relação aos últimos anos. Os pequenos produtores pouco tecnificados, por não terem subsídio e apoio do governo, e com normativas que estabelecem um padrão de qualidade mais severo, têm mostrado dificuldade em se manter na cadeia produtiva do leite, muitas vezes, abandonando a atividade. Por outro lado, os grandes produtores aumentaram cada vez mais a produção, agregando valor aos seus produtos, melhorando a tecnificação de seus estabelecimentos e empregando mão de obra qualificada.

Essas grandes propriedades apresentam, além da tecnificação, rebanhos grandiosos, em sua maioria, sistema de confinamento e animais de raças especializadas, visando maior produção. Todos esses fatores contribuem para a disseminação e manutenção de agentes contagiosos, de transmissão direta, como o *Mycoplasma bovis* no rebanho.

2.2. Mastite:

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, que pode ter origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e principalmente infecciosa (RADOSTITIS et al., 2007). É uma doença complexa e multifatorial, influenciada pelo ambiente, diversos patógenos e também alguns fatores relacionados ao próprio animal (BRESSAN, 2000).

Apresenta-se de duas formas denominadas: mastite clínica e subclínica. Recebe a primeira denominação quando é possível observar alterações como edema, aumento de temperatura local, hiperemia, sensibilidade e enrijecimento da glândula mamária (fibrose), bem como o aparecimento de grumos, pus,

sangue ou qualquer outra alteração nas características do leite (MARGATHO et al., 1998). Pode ser aguda apresentando sintomatologia evidente de processo inflamatório (edema, dor, calor, rubor) ou crônica, caracterizada por fibrosamento, ausência de sinais de processo inflamatório e alterações no leite, como grumos e coágulos (COSTA, 1998). A mastite clínica ocasiona perdas elevadas por descarte do leite, gastos com medicamentos, perda funcional de glândulas e até morte do animal (SANTOS & FONSECA, 2007). O diagnóstico é realizado pela avaliação do aspecto do leite, quanto às características peculiares observadas no produto, pela prova de Tamis.

As perdas decorrentes deste processo infeccioso geralmente estão de acordo com o grau de intensidade do processo inflamatório e do estágio de lactação em que ocorre a infecção (SILVA & ARAÚJO, 2008). De acordo com Bartlett et al. (1991), a redução na produção de leite devido à mastite clínica pode ser dividida em duas fases distintas: na primeira, considerada fase aguda, ocorre rápido declínio de produção logo após o aparecimento dos sintomas, seguido de rápida recuperação e dura em torno de seis dias. A queda na produção é de aproximadamente 30% durante este período. Após a fase aguda, tem início outra fase com duração aproximada de 60 dias, na qual a produção ainda é abaixo do normal, podendo persistir até o final da lactação (HORTET e SEEGER, 1998).

A mastite subclínica caracteriza-se pela infecção inaparente e queda na produção, com alterações na composição do leite, como aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura (SANTOS e FONSECA, 2007), sem modificar suas características físicas. A glândula mamária também não apresenta modificações visíveis.

2.3. Agentes etiológicos envolvidos na mastite:

Quanto à sua etiologia, os agentes podem ser divididos em ambientais ou contagiosos. Os agentes ambientais estão predominantemente no ambiente em que o animal vive, principalmente onde há acúmulo de esterco, urina, barro e cama orgânica. De forma oportunista invadem a glândula mamária, causando na maioria das vezes, mastite clínica (BLOWEY & EDMONDSON, 2010).

Podem ser agrupadas em dois principais grupos, com suas características próprias: os coliformes e os estreptococos ambientais. Destacam-se neste grupo de patógenos *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*. Geralmente as infecções causadas por coliformes são de curta duração, com quadros agudos em 20% dos casos, podendo ocasionar febre, anorexia, desidratação, perda de peso e da produção leiteira em poucas horas. Ocorre com maior frequência no período seco ou início da lactação (SANTOS e FONSECA, 2007).

Os agentes contagiosos têm como principal fonte de contaminação, o úbere e são transmitidos de um animal ao outro principalmente durante a ordenha pelas teteiras, mãos de ordenhadores ou outros fômites que sejam de uso comum entre um quarto sadio e um infectado (BLOWEY & EDMONDSON, 2010). Os casos de mastite contagiosa caracterizam-se pela menor incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, com altas contagens de células somáticas.

Os principais agentes contagiosos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (JAYARAO e WOLFGANG, 2003). Na maioria dos estudos, relata-se prevalência de agentes como *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, pois estes podem ser isolados e identificados por métodos microbiológicos convencionais. Em contraste, *Mycoplasma bovis* necessita de métodos complexos para o seu isolamento e identificação, acreditando-se que a real prevalência de *Mycoplasma bovis* é, provavelmente, subestimada (KAMPA, 2009).

Staphylococcus aureus é um dos patógenos mais frequentemente isolados na mastite bovina e os principais sítios de localização parecem ser os quartos mamários infectados. A transmissão ocorre usualmente entre vacas durante a ordenha, pelas mãos de ordenhadores, equipamentos, sendo que o conhecimento de sua distribuição pode auxiliar na elaboração de medidas de controle para a doença (SALASIA et al., 2004). Este patógeno pode chegar ao leite diretamente pela excreção de quartos com mastite clínica ou subclínica, ou até mesmo por contaminação durante a manipulação e processamento do leite cru (SCHERRER, 2004; JORGENSEN, 2005). É também frequentemente causador de infecções em humanos, podendo ser sério problema no caso de

cepas resistentes aos antimicrobianos (SCHLEGELOVA, 2003) e produtoras de enterotoxinas (GUIMARÃES et al., 2013).

Algumas características de virulência que contribuem para a persistência de *S. aureus* no tecido mamário (SANTOS et. al., 2003) e o uso inadequado de antibióticos, que propiciam o aparecimento de cepas multi-resistentes, são fatores que comprometem a eficiência do tratamento da mastite bovina causada por estes micro-organismos (BARBERIO et al., 2002).

Assim como o *S. aureus*, *S. agalactiae* é um agente contagioso, facilmente transmitido vaca a vaca durante o processo de ordenha. O reservatório primário de infecção é o úbere, apesar de ocasionalmente colonizarem o canal do teto e até mesmo a pele do teto, especialmente se a superfície apresentar rachaduras (BLOWEY & EDMONDSON, 2010). Em muitos países, a infecção intramamária causada por *Streptococcus agalactiae* ainda é muito comum (ZADOKS e FITZPATRICK, 2009). Elias et al., (2012) encontraram prevalência de 39,7% de *S. agalactiae*, em propriedades localizadas em Minas Gerais.

2.3.1. Micoplasma:

Mycoplasma spp. é um patógeno altamente contagioso em bovinos, podendo causar pneumonias, artrite, otite e menos frequentemente abortamentos e meningites, além de mastites (NICHOLAS & AYLING, 2003). Na maioria dos casos a disseminação do agente no organismo é via descendente, afetando primeiramente pulmão ou outros órgãos e posteriormente, via sanguínea alcança a glândula mamária (FOX et al.2005).

São as menores células procariontes capazes de auto-replicação (QUINN, 1994). São micro-organismos pleomórficos (RAZIN et al., 1998), não tendo a capacidade de sintetizar peptideoglicano ou seus precursores. Não possuem parede celular rígida, apresentando membranas externas flexíveis com três extratos, susceptíveis à dessecação, calor, detergentes e aos desinfetantes (QUINN et al., 2005) e resistentes aos principais antimicrobianos disponíveis (OWENS e NIPPER, 2008).

Apresenta genoma simplificado e crescimento fastidioso, o que pode ser associado à replicação lenta e dificuldade de identificação em casos de

mastite. É possível que muitos casos de mastites causadas por *Mycoplasma* possam ser sub diagnosticados (FOX et al, 2005).

As duas espécies de micoplasmas mais comuns nas mastites são *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma californicum*, sendo a primeira considerada como principal espécie em surtos de mastites, em diversas partes do mundo (NICHOLAS et al., 2008). *M. bovis* pode ser introduzido em rebanhos livres da doença pela aquisição de animais portadores (BENNET & JASPER 1977).

A maioria das infecções intramamárias causadas por micoplasmas são transmitidas pelas mãos de ordenhadores, equipamentos de ordenha e o uso de cânulas de uso múltiplo para tratamento. Além disso, são encontradas vacas portadoras do agente que, de maneira intermitente, eliminam micoplasmas pelo leite, consideradas, portanto, como fontes de infecção (SANTOS, 2003). Tal fato pode levar a sérios problemas no rebanho se o nível de infecção não for controlado. Segundo Pretto et al. (2001), as principais medidas de controle de surtos são a detecção, segregação e o descarte de animais positivos, pois com isso torna-se possível evitar a propagação do agente para outros animais. E, ainda, paralelamente são recomendadas as medidas preventivas para as mastites contagiosas como a higiene de ordenha, imersão dos tetos em solução antisséptica antes e após a ordenha, desinfecção e manutenção dos equipamentos de ordenha.

Vacas com mastite causada por *Mycoplasma* spp. geralmente desenvolvem infecções múltiplas nos quartos, podendo apresentar todos os quartos infectados, acompanhado de um quadro sistêmico como febre, inapetência, caracterizando-se como mastite aguda. A transmissão entre quartos de uma mesma vaca pode ocorrer via sanguínea, embora na maioria dos casos ocorra por gotículas de leite contaminado (SANTOS, 2003). Quartos afetados podem não desenvolver a doença clínica, porém a infecção pode causar acentuada queda na produção, muitas vezes referida como agalactia, ou seja, ausência súbita de leite (BLOWEY & EDMONDSON, 2010).

O leite anormal proveniente de um rebanho com mastite por micro-organismos desse gênero pode ter coloração amarronzada à acastanhada e ainda quando mantido em repouso pode ter aparência arenosa ou de grânulos (KIRK e MELLEBERGER, 1994).

O primeiro caso de mastite bovina por micoplasma foi relatado por Hale

et al. (1962), tendo o agente recebido o nome de *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*, posteriormente denominado de *Mycoplasma bovis* por Aska e Erno (1976). Foi considerado mais frequente e patogênico nas infecções intramamárias (BOOTHBY, 1986), e responsável por surtos esporádicos de alta contagiosidade (JASPER, 1987).

Apesar dos poucos relatos de mastites por *Mycoplasma bovis* no Brasil, a primeira citação de casos de mastite por esse agente foi de Mettifogo et al. (1996) na região de Londrina-PR, que evidenciaram a importância desse patógeno como causador de mastites. Por outro lado, Pretto et al. (2001) trabalhando com 713 vacas leiteiras provenientes de três propriedades leiteiras localizadas na região norte do Paraná e sudoeste do Estado de São Paulo, entre as quais 137 apresentavam mastite, detectaram oito animais (1,12%) com mastite por *Mycoplasma bovis* confirmando a participação desse patógeno na etiologia dessa infecção. Com relação as 137 de vacas com mastite, oito foram positivas para micoplasma (5,83% delas).

A literatura relata prevalência de 0,5 a 35% de mastite causada por *Mycoplasma bovis* em diversos países (GONZÁLEZ e WILSON, 2003). No Brasil, a pesquisa desse agente, assim como de outras espécies de micoplasmas, tanto nas mastites como em outras patologias dos sistemas respiratório, urogenital, articulações, sistema nervoso e conjuntiva ocular são pouco frequentes (BUZINHANI et al., 2007).

A cultura para isolamento de micoplasma requer meios e tempo de incubação especiais, além de condições de microaerofilia, visto que são comuns amostras de leite de vaca com alterações sugestivas apresentarem-se negativas a sucessivas culturas realizadas a partir de métodos microbiológicos padrões (PHILPOT e NICKERSON, 2002). Porém, o cultivo de micoplasmas pode ser prejudicado mesmo quando se utilizam condições ideais. O tipo de amostra clínica, o método de coleta e transporte, a exigência nutricional e o número de micoplasmas viáveis no material clínico podem interferir no resultado (BUZINHANI et al., 2007).

Como alternativa aos métodos convencionais de detecção de *Mycoplasma*, há atualmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) que é acurado e amplamente aceito como um método confiável para detecção de

cepas de *Mycoplasma* em amostras de leite (GHADERSOHI, 1997; BAIRD, 1999; RIFFON, 2001; SUNG, 2006).

O rápido diagnóstico por técnicas moleculares torna possível a detecção de animais infectados, prevenindo-se assim surtos de mastites causadas por micoplasma. Diversos estudos têm demonstrado a eficácia da PCR para a detecção *Mycoplasma* spp. (CARDOSO, 2000).

Técnicas moleculares podem ser utilizadas na identificação e tipagem de patógenos por técnicas como PCR, com uso de *primers* específicos, que apresentam alta especificidade e sensibilidade para a amplificação de um determinado fragmento de DNA específico do patógeno, seguida de sequenciamento. A caracterização genotípica é necessária para revelar genótipos recombinantes e alelos atípicos, avaliar a diversidade genética, encontrar os fatores genéticos que podem influenciar a virulência, entender eventuais mecanismos de seleção de genótipos de acordo com a espécie hospedeira e investigar relações entre o genótipo e a doença animal (BOWMAN, 1993).

No rebanho o micro-organismo dissemina-se durante a ordenha por aerossóis e secreções de animais com distúrbios respiratórios e genitais. As vias hematogena ou linfática são responsabilizadas pela disseminação de micoplasma de um órgão para outro (BENNET e JASPER, 1977).

Há poucas estimativas dos custos de infecção por *M. bovis*. Um relatório de custos estimados nos EUA indicam perdas de 108 milhões de dólares por ano para a indústria de laticínios. No entanto, dadas as limitações dos dados de prevalência, esses números devem ser interpretados com cautela (ROSENGARTEN, et al., 1999) e se refere à redução de produção, gastos com medicamentos, mão de obra e descarte precoce de vacas infectadas. A implementação de medidas de diagnóstico e de controle possuem elevado custo em relação a outros patógenos, pois a doença tende a ser crônica e pouco responsiva ao tratamento (WILSON et al., 1997; FULTON et al., 2009).

As principais medidas de controle das mastites por *M. bovis* são a detecção e segregação de animais infectados, seguido do descarte. Paralelamente, são recomendadas as medidas preventivas para as mastites contagiosas como a higiene de ordenha, imersão dos tetos em solução antisséptica antes e após a ordenha, desinfecção e manutenção dos

equipamentos de ordenha (GUNNING & SHEPHERD, 1996), além da manutenção do ambiente de ordenha, e onde os animais são estabulados ou mantidos, sempre limpos e higienizados, com retirada manual de fezes, lavagem e desinfecção.

3. Objetivos:

Objetivo geral:

Avaliar a prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras no estado de São Paulo.

Objetivos específicos:

Estudar a etiologia da mastite com base nos principais agentes contagiosos causadores: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*.

4. Material e métodos:

Para a definição do número de amostras, a coleta de materiais foi dividida em duas etapas: triagem e coleta individual. Utilizou-se prevalência estimada de 5% de *Mycoplasma bovis* no leite, com base em outros estudos (FOX et al., 2005) intervalo de confiança de 95% e margem de erro de 5%, com base em uma população estimada em 800 rebanhos, obtendo-se um número de 67 propriedades para a fase de triagem, todas localizadas no estado de São Paulo.

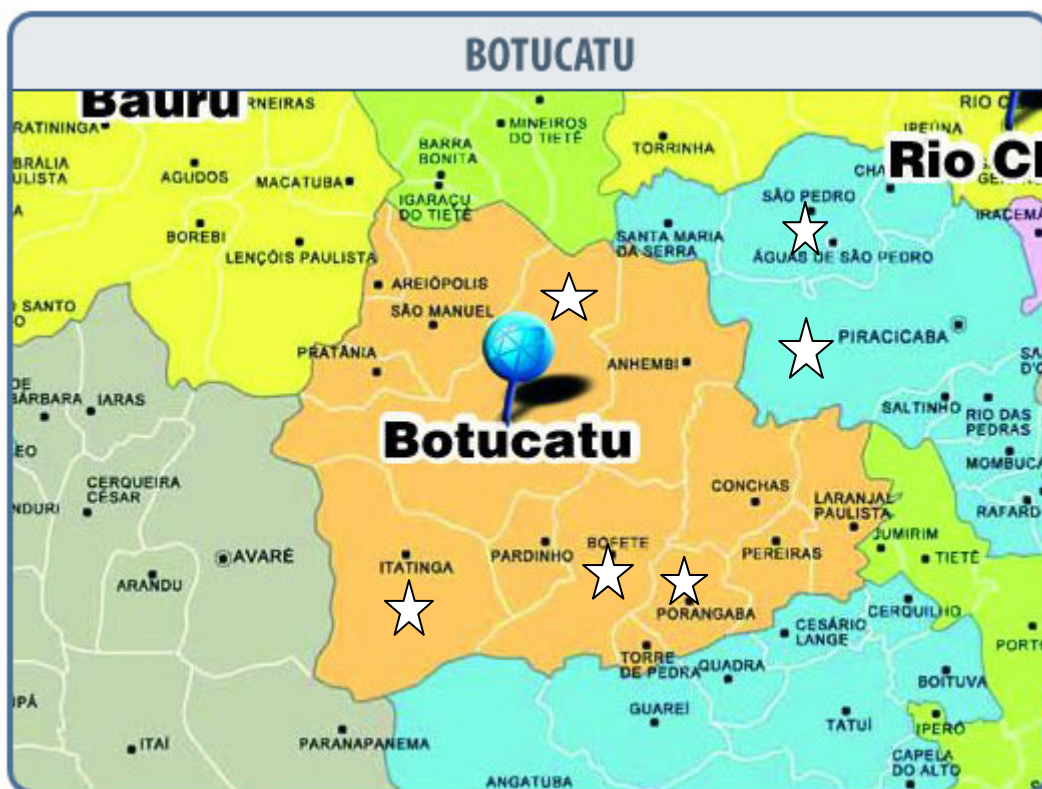


Figura 1: Distribuição geográfica das propriedades em estudo no estado de São Paulo, 2013 (cidades marcadas com estrelas: Botucatu, Itatinga, Bofete, Porangaba, São Pedro e Piracicaba).

4.1. Delineamento experimental:

O estudo foi separado em duas etapas: triagem e coleta individual. Dessa forma, foi possível verificar a prevalência dos rebanhos na região em estudo e, posteriormente, a prevalência dentro dos rebanhos positivos, verificando quais e quantos animais estavam infectados.

4.1.1.Triagem:

Na fase de triagem, foram utilizadas 67 propriedades localizadas no estado de São Paulo. Para aumentar a sensibilidade do estudo, foram realizadas três coletas em cada uma das 67 propriedades, com intervalo de 15 ± 7 dias entre as coletas.

As amostras de leite foram colhidas diretamente dos tanques após homogeneização com auxílio de concha de alumínio previamente esterilizada, acondicionadas em frascos coletores universais estéreis e transportadas sob refrigeração (4-8 C), em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, até o Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu-SP. Foram coletadas duas alíquotas de aproximadamente 25 mL: uma destinada à contagem de células somáticas e outra para a detecção molecular por PCR.

No caso de propriedades que não possuíam tanque de refrigeração e, portanto, faziam uso de tanques comunitários, a coleta foi realizada diretamente do recipiente no qual o leite chegava, latão, após homogeneização.

4.1.2. Coleta individual:

Em propriedades com amostra do tanque positivas para *Mycoplasma bovis* pela técnica de PCR, realizou-se a coleta de leite de todos os animais em lactação. Foi realizada a prova de Tamis em todos os tetos de todas as vacas, e realizado CMT em todas as vacas e a partir da reação 1+, coletaram-se amostras para contagem de células somáticas (CCS) em tubos apropriados contendo conservante bronopol, até o momento da análise. Foi realizada a lavagem com água e desinfecção do óstio do teto com solução de álcool

iodado a 0,25% e colhidas amostras de 5 mL de leite em duplicata, em frascos estéreis, para a realização de exame microbiológico bem como para o estudo molecular da presença de *Mycoplasma bovis*. As amostras foram transportadas para o laboratório sob temperatura de refrigeração, em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável.

4.1.1. Diagnóstico laboratorial:

As amostras de leite dos tanques das 67 propriedades foram submetidas a contagem de células somáticas e a detecção molecular de *Mycoplasma* sp. e *Mycoplasma bovis*. Já as amostras de leite dos quartos positivos ao CMT na coleta individual foram submetidas a cultivo microbiológico convencional e contagem de células somáticas. Foram ainda submetidas a provas moleculares para detecção de *Mycoplasma bovis*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, e cultivo em caldo SP4 para isolamento de *Mycoplasma bovis*.

4.2.2. Contagem de Células Somáticas:

A contagem eletrônica de células somáticas das amostras de leite foi realizada por citometria de fluxo com equipamento Somacount 300® (BENTLEY, 1995) no Laboratório do NUPEMAS da FMVZ UNESP-Botucatu-SP. Foram utilizados frascos plásticos próprios, contendo conservante (bronopol). Este conservante apresenta formato de pastilha que, em contato com o leite, forma uma mistura de coloração róseo-claro. As amostras colhidas permaneceram em temperatura ambiente por, no máximo, cinco dias após a colheita, para a realização das análises.

Na técnica de citometria de fluxo, as células coradas são carregadas por um líquido sendo excitadas por um feixe de laser. Os núcleos corados emitem, por fluorescência, impulsos luminosos que são ampliados por um foto multiplicador, contados e convertidos em concentração de células somáticas (SILVEIRA et al., 2005). Foram obtidas amostras ao redor de 40 mL de leite dos tetos positivos ao CMT, de cada animal.

4.2.3. Cultivo das amostras de leite – coleta individual

Foi realizado o cultivo convencional das amostras de leite semeando-se 0,01 mL de leite de cada amostra em meio de ágar base adicionado de 5% de sangue bovino, bem como em ágar MacConkey, incubando-se as placas a 37°C com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, por três dias. A morfologia das colônias foi avaliada, com relação ao tamanho, forma, odor, pigmento e hemólise. Foi também realizado o exame bacterioscópico por lâminas coradas pelo método de Gram, verificando-se ao microscópio características tintoriais e morfológicas. Foram consideradas como amostras positivas as que revelaram o isolamento de três ou mais colônias de um mesmo micro-organismo, exceto para estafilococo beta hemolítico que foi considerada como positiva a partir do isolamento de uma única colônia. No caso de isolamento de três ou mais micro-organismos distintos a amostra foi considerada como contaminada (NATIONAL MASTITIS COUNCIL-NMC, 1987). Os micro-organismos isolados foram repicados em meio de caldo-cerebro-coração, para a realização de provas bioquímicas de identificação.

4.2.4. Identificação de *S. aureus*:

De acordo com as características fenotípicas das colônias, como tamanho, produção de pigmento e hemólise, e morfologia como cocos Gram positivos agrupados em forma de cachos na bacterioscopia, foi realizada a prova de catalase para confirmação do gênero, diferenciando-se de *Streptococcus* spp. Sendo a prova positiva, a linhagem foi submetida à prova de coagulase. Uma vez positiva à prova de coagulase em tubo, foi classificada como *Staphylococcus aureus* o isolado que fermentou a maltose, o manitol e a trealose; produziu acetoina e apresentou resistência à polimixina-B (KONEMAN et al., 1997).

4.2.5. Identificação de *Streptococcus agalactiae*

Os estreptococos isolados nas amostras de leite foram diferenciados por dois testes:

- 1) Camp Test, pelo sinergismo com aumento da beta hemólise;
- 2) Hidrólise da Esculina (QUINN et al., 1994).

4.3. Detecção molecular :

4.3.1. Extração do DNA:

As amostras de leite foram mantidas congeladas a -80°C até o momento da extração e descongeladas em temperatura ambiente, até atingirem aproximadamente 20°C. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), com algumas adaptações previamente padronizadas no laboratório de biologia molecular aplicada ao diagnóstico de zoonoses – UNESP- Botucatu-SP.

A extração foi realizada a partir de 200µL de leite, aliquoteado em microtubo de 1,5mL DNase free, como segue:

Centrifugou-se a 10000g por 1 minuto e retirou a gordura com swab. Posteriormente, centrifugou a 10000g por 1 minuto. Retirou-se o sobrenadante com pipeta, adicionando-se ao *pellet* 40µL de tampão de lisozima. Homogeneizou-se rapidamente no vórtex e adicionou-se 10µL de lisozima (10mg/mL). Logo após incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente (5 em 5 minutos vórtex). Adicionou-se 10µL de proteinase K (20mg/mL) e homogeneizou-se com vórtex. Em seguida, manteve-se em banho-maria a 56°C por 15 minutos. Adicionou-se 400µL de tampão de lise e manteve-se 10 minutos com agitação constante com breve spin (10segundos). Colocou-se a coluna no tubo coletor (identificar) e pré-aqueceu-se à 70°C o tampão de eluição. Transferiu-se então o conteúdo do microtubo para a coluna e centrifugou-se a 11000g por 1 minuto, descartando-se o centrifugado, retornando-se o tubo coletor à coluna. Em seguida, adicionou-se 500µL do tampão de lise e centrifugou-se a 11000g por 1 minuto. Adicionou-se 500µL do tampão de lavagem e centrifugou-se novamente a 11000g por 3 minutos.

Desprezou-se o tubo coletor e colocou-se a coluna em microtubo de 1,5mL (DNAse-free), adicionando-se a seguir 200µL do tampão de eluição (70°C), mantendo-se por um minuto a temperatura ambiente e centrifugou-se a 11000g por 1 minuto. Por fim, estocaram-se as amostras em geladeira (4°C) por 24 horas; Estocar as amostras a -20°.

A quantificação foi realizada pela corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% com marcadores low mass DNA (Invitrogen).

4.3.2. PCR para detecção molecular de *Mollicutes* e *Mycoplasma bovis*

Foram utilizados iniciadores que amplificam regiões espécie-específicas do DNA codificadoras das regiões 16S e 23S rRNA, baseado nas sequências do banco de dados do GenBank.

As reações de PCR foram realizadas com um volume total de 25µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8,0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de dNTP, 10pM de cada *primer*, 0,5 unidades de *Taq* Platinum (Invitrogen) e 10ng de DNA. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

A amplificação do DNA de *Mollicutes* foi realizada utilizando 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'), com um produto de 270 pares de base (VAN KUPPEVELD et al., 1992) e perfil de ciclos como segue: cinco minutos a 94°C, trinta e cinco ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 min.

Uma vez positivas para a PCR com *primers* genéricos, foi realizada a amplificação do DNA de *Mycoplasma bovis* com o uso dos *primers* específicos *MBO*r (5' CCG TCA AGG TAG CAT CAT TTC CTA T 3') e *MBO*f (5' CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG 3'), com produto de 360 pares de bases (GONZÁLEZ et al., 1995) e o seguinte perfil de ciclo: um ciclo de 94°C por três minutos, trinta e cinco ciclos de 94°C por um minuto, 60°C por um minuto, 72°C por um minuto e uma etapa final de 72°C por três minutos.

A visualização do material amplificado foi avaliada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,025µL/mL de brometo de etídeo. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e a voltagem empregada foi de 65V. Após o término da corrida, o gel foi visualizado em transluminador de luz UV (MANIATIS et al., 1982) e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital.

Foram utilizados 8µL do material amplificado e como marcador de peso molecular 4 µL de 100pb ladder (Invitrogen). Para todas as amostras foram acrescidos 2 µL do tampão de corrida (0,25% azul de bromophenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q).

4.3.3. Estudos moleculares dos agentes contagiosos

4.3.3.1. *S. aureus*:

Para estudo molecular de *S. aureus*, foram utilizados os *primers* Staur 4 (5'-ACGGAGTTACAAAGGACGAC-3') e Staur 6 (5'-AGCTCAGCCTTAACGAGTAC-3'), com produto de 1250 pares de base (STRAUB et al., 1999; RIFFON et al., 2001) com o seguinte perfil de ciclagem: 2 min a 94°C, 45s a 94°C, 1 min a 64°C, 2 min a 72°C (35 ciclos) e extensão final 10 min a 72°C.

4.3.3.2. *S. agalactiae*

Para amplificação de *S. agalactiae* foram utilizados os *primers* SAGA1 (5'-CGT TGGTAGGAGTGGAAAAT-3') e SAGA2 (5'-CTGCTCCGAAGAGAAAGCCT-3'), com produto de 590 pares de bases, com o perfil de ciclos de 5 min a 96°C, 1 minuto a 96°C (30 ciclos), 1 min; 1 min a 55°C, 2 min a 72°C, e extensão final a 72°C por 2 min.

4.4. Cultivo de *Mycoplasma*:

Para isolamento de *Mycoplasma bovis* foi realizado previamente a padronização de técnicas de cultivo a partir de amostras de leite bovino e estabelecido o seguinte protocolo: Foram cultivados 0,2mL de cada amostra diretamente em meio SP4 (triptona, peptona e caldo base) líquido, suplementado com soro fetal bovino, meio 199, extrato de levedura, glicose, arginina, bacto TC yeastolate, vermelho fenol, acetato de thalium e penicilina, anfotericina- B e estreptomicina. Simultaneamente, foram cultivados 0,05mL de cada amostra em placas de Petri (Pleion A-24) em meio sólido SP4 (triptona, peptona, caldo base e ágar noble) suplementado, conforme descrito anteriormente. A incubação foi procedida em ambiente de microaerofilia, em estufa de CO₂, com posterior observação do isolamento microbiano por até 15 dias de incubação.

A avaliação do isolamento de micoplasmas foi realizada pela visualização em microscópio invertido e estereomicroscópio pelo exame das placas de cultivo, de colônias apresentando aspecto característico de “ovo-frito” e com formação de filmes e manchas conforme descrito por Pretto et al. (2001).

Para confirmação do gênero *Mycoplasma* foram realizadas três filtrações (membrana 0,22µm) sucessivas do caldo SP-4, incubados a 37°C em ambiente de microaerofilia até o momento da mudança de coloração do caldo, que indica a alteração do pH.

5.Resultados

5.1.Triagem:

5.1.1. Contagem de células somáticas:

A contagem de células somáticas ($\times 10^3$ CCS/mL) do leite dos tanques de expansão das propriedades revelou grande variação (31 a 2200 CS/mL) entre as três coletas. Além disso, 11,9% apresentaram CCS superior a valores estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2011).

5.1.2. PCR de amostras de tanques:

5.1.2.1. *Mollicutes*.:

De 201 amostras de leite submetidas a PCR com *primers* genéricos MGSO e GPO3, 11 (16,4%) amplificaram *Mollicutes* como pode se observar nas figuras abaixo. A figura 1 refere-se a um gel de 44 amostras de leite, com resultados positivos e negativos.

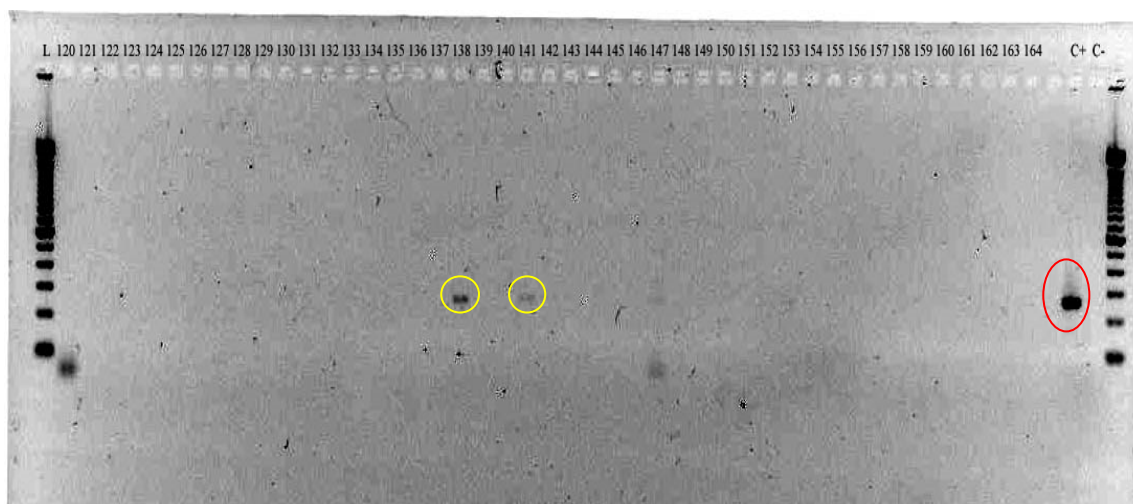


Figura 2: Gel de agarose com 44 amostras de leite de tanque após PCR

com *primers* genéricos MGSO e GPO3. (Marcador molecular de 100pb, amostras 120 a 164, controle positivo, controle negativo e marcador molecular, sendo as amostras 138 e 142 circuladas, positivas).

5.1.2.2. *M.bovis*:

As 11 amostras positivas na PCR com *primers* genéricos para *Mollicutes* foram submetidas a PCR com os *primers* específicos MboR e MboF e apenas uma amostra amplificou para *Mycoplasma bovis*, revelando uma frequência de 1,4% em relação as 67 propriedades e uma frequência de 9% em relação as amostras de micoplasma (amplificados com *primers* genéricos). A figura 3 ilustra a PCR das 11 amostras de *M.bovis* e os controles positivos e negativos.

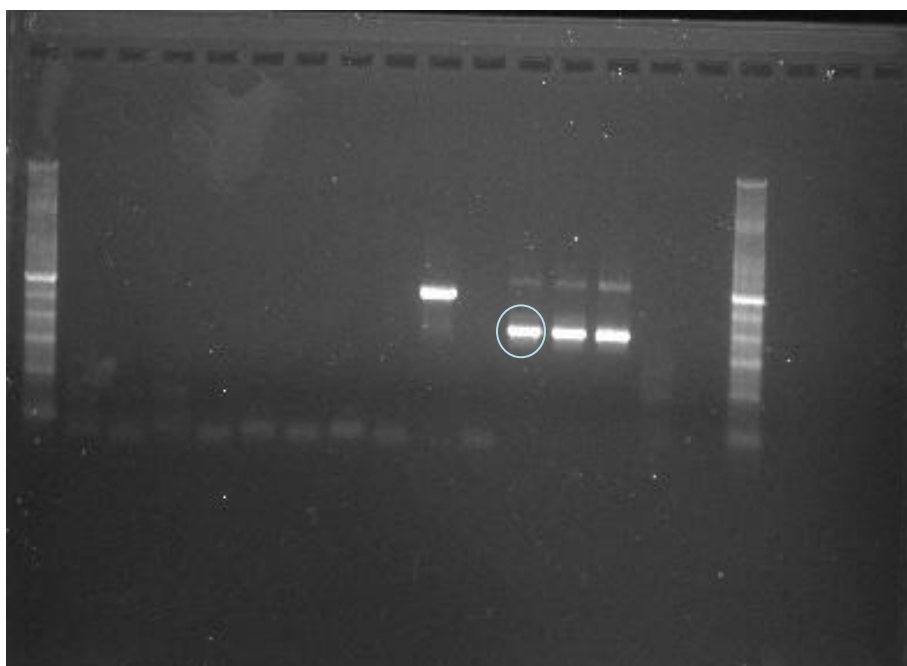


Figura 3: 11 Amostras de leite de tanque após reação de PCR para *Mycoplasma bovis*. Amostras e controles positivos. Marcador molecular de 100pb, 11 amostras (sendo a circulada a amostra positiva), dois controles positivos, controle negativo e marcador molecular.

Pode-se observar na tabela 1, que a única amostra positiva para *M.bovis* é oriunda da propriedade com maior rebanho presente no estudo (mais de 200 animais).

Tabela 1: Relação entre resultado da PCR para *M.bovis*, contagem de células somáticas do tanque e tamanho aproximado de cada rebanho (Onze rebanhos que foram previamente positivos para *Mollicutes* na PCR) Botucatu-SP, 2013.

Amostra	PCR <i>M.bovis</i>	CCS (x1000CS/mL)	Tamanho do rebanho (animais)
25	Negativa	135	< 50
34	Negativa	177	< 50
52	Negativa	311	< 50
56	Negativa	105	< 50
82	Negativa	528	< 50
87	Negativa	58	< 50
97	Negativa	296	< 50
108	Negativa	378	< 50
138	Negativa	346	< 50
141	Negativa	2007	De 50 a 100
172	Positiva	554	> 200

5.2. Coleta individual:

A propriedade cuja amostra de leite foi positiva para *M.bovis* foi visitada novamente para a coleta de leite individual dos animais em lactação após 4 meses da coleta dos tanques. Realizou-se Prova de Tamis e CMT em 152 vacas, totalizando 608 tetos (592 tetos funcionais e 16 perdidos).

Utilizando-se a prova de Tamis, pode-se observar 6 (1%) tetos com mastite clínica. O CMT revelou 10 tetos com reação uma cruz (1,7%), 58 duas cruzes (9,8%) e 95 três cruzes (16%) e 423 (71,4%) negativos. De 152 animais, 101 (66,4%) apresentaram mastite em pelo menos um quarto mamário.

Ao exame microbiológico convencional, pode-se observar a frequência de isolamento dos diferentes patógenos, na Tabela 2:

Tabela 2. Frequência de micro-organismos isolados em cultivo convencional a partir de amostras de leite de mastite clínica e subclínica do rebanho positivo para *M.bovis* no tanque, Botucatu-SP, 2013:

Micro-organismo	n (%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	76 (45)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (0,6)
Estafilococos coagulase negativa	7 (4,1)
Estreptococos ambientais	17 (10)
Coliformes	2 (1,2)
<i>Corynebacterium</i> spp.	2 (1,2)
<i>Pasteurella</i> sp.	1 (0,6)
Negativas	48 (28,4)
Contaminadas *	15 (8,8)
Total	169 (100)

*Foram consideradas como contaminadas amostras com isolamento de três ou mais micro-organismos (NMC,1987).

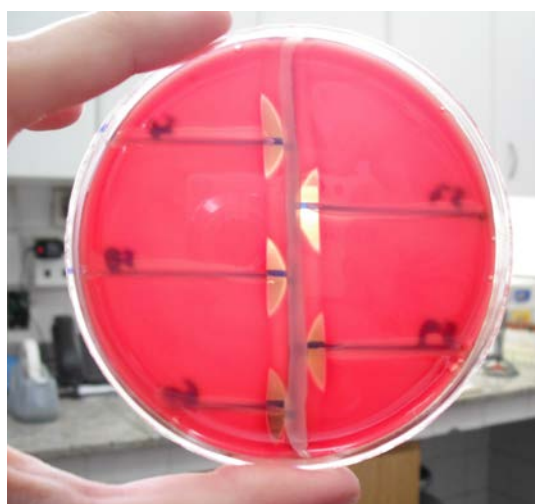


Figura 4: Camp Test positivo de isolados de *Streptococcus agalactiae* obtidos de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

5.2.1. Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* do leite:

Na PCR das amostras de leite para *S. aureus*, somente uma (0,5%) foi positiva. Já na PCR para *S. agalactiae*, 63 (37,2%) das 169 amostras de leite foram positivas.

Isolamento de mycoplasma:

Todas as amostras de leite foram negativas no cultivo em meio SP4 em caldo, os quais não modificaram sua coloração, e em placa, pela ausência de colônias características. Este resultado mostra que esta técnica é pouco sensível, não sendo indicada para isolamento de *Mycoplasma*.

6. Discussão:

Na fase de triagem, em que amostras de leite de tanque foram analisadas, pode-se observar prevalência do gênero *Mycoplasma* na região de Botucatu-SP, foi de 16,4%. A prevalência deste agente em diferentes países é muito variável, tendo relatos de 2,6% em Québec (FRANCOZ, et al., 2012) até 55% no México (MIRANDA-MORALES, et al., 2008).

A amostragem a partir do leite de tanques vem sendo muito utilizada em diversos países, considerada como indicador representativo da infecção nas vacas. Este procedimento pode ser considerado como triagem em inquéritos de vigilância epidemiológica para a detecção deste patógeno como agente de mastite na propriedade tornando o procedimento mais ágil e menos oneroso, já que o isolamento deste micro-organismo, além de mais demorado, exige meios e condições especiais de cultivo microbiológico.

Das 11 (16,4%) amostras positivas para a classe *Mollicutes*, 1 (1,4%) foi positiva para *M. bovis*. Prevalências igualmente baixas foram encontradas em estudos de tanques em outros países como de 5,4% na Grécia (FILIOUSIS et al., 2007), de 1 a 8% nos Estados Unidos (FOX et al., 2003), 1,8% na Tailândia (KAMPA et al., 2009) e 1,5% na Bélgica (PASSCHYN et al., 2011) não tendo sido isolado na Nova Zelândia (McDONALD et al., 2009).

M. bovis é a espécie mais comum no que se refere a mastite causada por esta gênero. Porém, os primers utilizados para detecção genérica incluem

todos os micro-organismos da classe mollicutes. Assim, podem ter sido detectadas outras espécies de micoplasmas que podem causar mastites, como *M. alkalenses*, *M. arginini*, *M. bovigenitalium*, *M. bovirhinis*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. dispar*, assim como patógenos de outro gênero já relatados em casos de infecção da glândula mamária como *Acholeaplasma* spp. (principalmente *A. laidlawii* e *A. axanthum*) (GONZÁLEZ & WILSON, 2003).

Destaca-se ainda nos resultados do presente estudo, que as onze amostras positivas para *Mycoplasma* spp. foram oriundas de propriedades distintas encontradas em diferentes coletas entre as três realizadas. Estudo similar realizado com amostras de leite de tanques, em Quebec (FRANCOZ, et al., 2012), revelou da mesma forma, que os mesmos tanques com a presença do agente em um mês, não mais apresentavam no mês subsequente. Tal fato pode ser justificado pela baixa quantidade do agente excretada no leite de tetos infectados, podendo ser menor que 10 UFC/mL, valor mínimo no limiar de detecção da técnica de PCR e muito menor que o limiar do cultivo, de 100 UFC/mL (BIDDLE et al., 2003). Estudos também sugerem que o leite oriundo de tetos infectados pode ser diluído em tantos outros litros de leite normal, influenciando na detecção (KIRK e LAUERMAN, 1994).

Quanto a CCS, pode-se notar que 61,2% dos rebanhos apresentaram valores superiores a 200.000 CS/mL, utilizado como ponto de corte universal para indicação de vacas com mastite. Ao se avaliar o resultado da CCS de acordo com a IN-62 (BRASIL, 2011). para tanques de expansão, observa-se que apenas 8 (11,9%) das propriedades apresentavam valores superiores a 600.000CS/mL de leite de acordo com a referida portaria, mostrando que apenas algumas propriedades oferecem leite considerado por legislação, não adequado para consumo e beneficiamento.

Já na etapa de coleta individual, a prevalência de *Mycoplasma* spp. foi de 13% e não encontrou-se *M. bovis*. Tal fato pode ser explicado, pois durante o estudo, houve um período de tempo entre as coletas dos tanques das propriedades e a coleta individual de leite dos animais, da propriedade onde havia sido detectado *M. bovis*. Os animais infectados, que eliminavam *M. bovis* detectado no tanque podem ter sido descartados, ou entrado no período seco ou morrido. Deve-se pensar ainda na possibilidade da forma autolimitante da doença, como sugerido por Roy et al.(2008). É possível a ocorrência de cura

espontânea nas mastites subclínicas, além de intermitência na eliminação de patógenos nas infecções intramamárias (SANTOS e FONSECA, 2007). Deve-se enfatizar que o presente estudo trabalhou com a hipótese de casos subclínicos de mastites e a detecção de *Mycoplasma* spp. Entretanto, *M. bovis* são micro-organismos de alta contagiosidade e isolados também de casos clínicos de mastite (FILOUSIS et al., 2007).

A prevalência de *S. agalactiae* nesta mesma propriedade foi de 45% de acordo com o cultivo e de 37,2% de acordo com a PCR. Tal dado discorda de alguns estudos que mostram maior sensibilidade em técnicas moleculares para detecção de patógenos. Porém, *S. agalactiae* tem perfil de eliminação muito intenso, sendo facilmente detectável ao cultivo em casos de foco na propriedade. Além disso, o cultivo microbiológico é considerado padrão ouro para isolamento de patógenos (ZAFALON et al., 2005).

A prevalência de *S. aureus* foi a mesma (0,5%) de acordo com os resultados tanto da PCR quanto exame microbiológico. Tal dado pode ser devido à alta sensibilidade dos *primers* utilizados na detecção deste patógeno e a possibilidade de excreção intermitente (LANGONI, 2007), dificultando, por vezes o isolamento no cultivo microbiológico.

Comparando a prevalência dos patógenos avaliados nas amostras individuais de leite dos animais de uma propriedade que foi positiva para *M. bovis*, no leite de conjunto (tanque) pode-se observar que o patógeno predominante foi *S. agalactiae* (45%), seguido de *S. aureus* (0,5%) e *M. bovis* (0%). Nota-se grande diferença entre os dois primeiros, fato provavelmente devido ao manejo na propriedade, pois ela tem estabelecido programas de controle de vacas repetidoras de mastites por *S. aureus*, além da separação de lotes (BLOWEY e EDMONDSON, 2010). Apesar deste aspecto, no geral, a propriedade ainda apresenta manejo deficiente no que diz respeito à transmissão de patógenos contagiosos no geral, revelada pela alta prevalência de *S. agalactiae*.

Conclusão:

Pode-se concluir com o presente estudo, pela baixa frequência de *Mycoplasma bovis* em vacas de rebanhos leiteiros no estado de São Paulo, demonstrando que este agente não apresenta grande importância como causador de mastite na região em estudo.

8. Referências

ALYING, R. D.; BASHIRUDDIN, S. E.; NICHOLAS, R. A. Mycoplasma species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet. Rec.*, v. 155, n. 14, p. 413-416, 2004.

ASKA, G.; ERNO, H. Evallution of *Mycoplasma agalactiae* subs. *Bovis* to species rank *Mycoplasma bovis* (Hale et. al.) Comb. Nov. Ins. *J. Syst. Bacteriol.*, n. 26, p. 323-325, 1976.

BAIRD, S.C.; CARMAN, J.; DINSMORE, R.P.; WALKER, R.L.; COLLINS, J.K. Detection and identification of Mycoplasma from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 1999, 11, 432-435

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. *Napgama*, v. 5, n. 1, p. 10, 2002.

BENTLEY. *Somacount 300*: Operator’s manual. Chasca: Bentley Instruments, 1995.

BIDDLE, M. K.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D. Patterns of mycoplasma shedding in the milk of dairy cows with intramammary mycoplasma infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 223, n. 8, p. 1163-1166, 2003.

BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. *Mastitis control in dairy herds*. 2. ed. Cambridge: CAB International, 2010.

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

BOWMAN, B. H. A model PCR/probe system for the identification of fungal pathogens. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. (Ed.). *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 423-430.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção1, p.6.

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

BROWN, M. B.; SHEARER, J. K.; ELVINGER, F. Mycoplasmal mastitis in a dairy herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 196, p. 1097-1101, 1990.

BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. E *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, p. 1368-1375, 2007.

CARDOSO, M. V.; BLANCHARD, A.; FERRIS, S.; VERLENGIA, R.; TIMENETSKY, J.; FLORIO DA CUNHA, R.A. Detection of *Ureaplasma*

diversum in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Vet. Microbiol.*, v. 72, p. 241-250, 2000.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. *Rev. Educ. Contin.*, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1998.

ELIAS, A. O.; CORTEZ, A.; BRANDÃO, P. E.; SILVA, R. C.; LANGONI, H. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. *Res. Vet. Sci.*, v. 93, p. 34-38, 2012.

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

FILOUSIS, G.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; THATCHER, A.; PETRIDOU, V.; BOURTZI-CHATZOPOULOU, E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis in Northern Greece. *Vet. J.*, v. 173, p. 215-218, 2007.

FOX, L. K.; KIRK, J. H.; BRITTEN, A. Mycoplasma Mastitis: a review of transmission and control. *J. Vet. Med. Ser. B*, v. 52, n. 4, p. 153-160, 2005.

ROY, J. P.; FRANCOZ, D.; LABRECQUE, O. Mastitis in a 7-week old calf caused by *Mycoplasma bovis*. *Vet. J.*, v. 176, n. 3, p. 403-404, 2008.

FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; MICKELSON, A.; BRITTON, A. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma* spp. In milk. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, v. 50, n. 2, p. 235-240, 2003.

FOX, L. K.; KIRK, J. H.; BRITTEN, A. Mycoplasma Mastitis: A Review of Transmission and Control. *Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, v. 52, p. 153-160, 2005.

FULTON, R. W.; SANGUE, K. S.; PANCIERA, R.J; Patologia dos pulmões e agentes infecciosos em confinamento pneumonias fatais e de relacionamento com a mortalidade, início da doença, e tratamentos. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 21, p. 464-477, 2009.

GHADERSOHI, A.; COELEN, R. J.; HIRST, R. G. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, v. 56, p. 87-98, 1997.

GONZALEZ, R. N.; SEARS, P. M.; MERRILL, R. A.; HAYES, G. L. Mastitis due to *Mycoplasma* in the state of New York during the period 1972–1990. *Cornell Vet.*, v. 82, p. 29, 1992.

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

GUIMARÃES, F. F.; NÓBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; PANTOJA, J. C. F.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J. Dairy Sci.*, v. 96, n. 5, p. 2866-2876, 2013.

GUNNING, R. F.; SHEPHERD, P. A. Outbreak of bovine *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Rec.*, v. 139, p. 23-24, 1996.

HALE, H. H.; HELMBOLTD, C.F.; PLASTRIDGE, W. N.; STULA, E. F. Bovine mastitis caused by a mycoplasma species. *Cornell Vet.*, v. 52, p. 582-591, 1962.

HIGUCHI, H.; IWANO, H.; KAWAI, K.; OHTA,T.; OBAYASHI, T.; HIROSE, K.; ITO, N.; YOKOTA, H.; TAMURA,Y.; NAGAHATA, H. A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. *J. Vet. Sci.*, v. 12, n. 2, p. 191-193, 2011.

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

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R.; HEGDE, N. V. Guidelines for monitoring bulk tank somatic cell and bacterial counts. *J. Dairy Sci.*, v. 80, p. 3561-3573, 2003.

JØRGENSEN, H. J.; MØRK, T.; RØRVIK, L. M. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci.*, v. 88, n. 11, p. 3810-3817, 2005.

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.

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

KIRK, J. H.; LAUERMAN, L. H. *Mycoplasma* mastitis in dairy cows. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v. 16, p. 541-551, 1994.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, W.C. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1997. 1395 p.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; SILVA, A.V. Aspectos etiológicos na mastite bovina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 20, p. 204-210, 1998.

LANGONI, H. Mastite bovina. Conceitos e fundamentos. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ/UNESP, 2007.

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.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

McDONALD, W. L.; RAWDON, R. G.; FITZMAURICE, J.; BOLOTOVSKI, I.; VOGES, H.; HUMPHREY, S.; FERNANDO, K.; CANAGASEBEY, Y.; THORNTON, R. N.; McINTYRE, L. Survey of bulk tank milk in New Zealand for *Mycoplasma bovis*, using species-specific nested PCR and culture. *N. Z. Vet. J.*, v. 57, p. 44-49, 2009.

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. *Mastite por Mycoplasma bovis: surtos em Minas Gerais levam ao descarte de animais produtivos*. São Sebastião do Paraíso: Qualy Milk, 2013. Disponível em: <<http://www.qualymilk.com/1/post/2013/09/mastite-por-mycoplasma-bovis-surtos-em-minas-gerais-levam-ao-descarte-de-animais-produtivos.html>>. Acesso em: 12 nov. 2013.

MARGATHO, L. F. F.; HIPOLITO, M.; KANETO, C. N. Métodos de prevenção, controle e tratamento da mastite bovina. *Bol.Téc. Inst. Biol.*, n. 9, p. 5-35, 1998.

MILES, H.; LESSER, W.; SEARS, P. The economic implications of bioengineered mastitis control. *J. Dairy Sci.*, v. 75, p. 596-605, 1992.

MIRANDA-MORALES, R. E., ROJAS-TREJO, V.; SEGURA-CANDELAS, R.; CARRILLO-CASAS, E.M.; SANCHEZ-GONZALEZ, M. G.; CASTOR, R.S.; TRIGO-TAVERA, F.J. Prevalence of pathogens associated with bovis mastitis in bulk tank Milk in Mexico. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1149, p. 300-302, 2009.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. *Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis*. Arlington: The national Mastitis Council-NMC, 1987.

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

OWENS, W. E.; NIPPER, W. A. Case study: Development of a *Mycoplasma* Mastitis control program in Louisiana. *Prof. Anim. Scient.*, v. 24, p.103-106, 2008. Disponível em:

<http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4035/is_200802/ai_n24393806>.

Acesso em: 15 jul. 2011.

PFUTZNER H.; SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as na agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev. Sci. Tech.*, v. 15, p. 1477-1494, 1996.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. *Vencendo a luta contra a mastite*. São Paulo: Editora Milkbuzz, 2002. 192 p.

PRETTO, L. G.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 21, p. 143-145, 2001.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby, 1994. 648 p.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p

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.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, p. 1094-1156, 1998.

RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H.; DUBREUIL, P.; DROLET, M.; LAGACÉ, J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 2584-2589, 2001.

ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. O papel de micoplasmas ruminantes em infecção sistêmica. In: STIPKOVITS, L.; ROSENGARTEN, R.; FREY, J. (Ed.). *Micoplasmas de ruminantes: patogenicidade, diagnóstico, epidemiologia e genética molecular*. Bruxelas: Comissão Europeia, 1999. p. 14-17.

SALASIA, S. I. O.; KHUZNAN, Z.; LAMMLER, C.; ZSCHOCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. *J. Vet. Sci.*, v. 5, p. 103-109, 2004.

SANTOS, M. C. *Curso sobre manejo de ordenha e qualidade do leite*. Vila Velha: UVV, 2001. 57 p.

SANTOS, F. G. B.; MOTA, R. A.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SOUZA, H. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; JOHNER, J. M. Q.; LEAL, N. A.; ALMEIDA, A. M. P.; LEAL-BALBINO, T. C. Tipagem molecular de *S. aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclinica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Napgama*, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, M.V. Biossegurança aplicada ao controle de mastite. *Balde Branco*, v. 463, p. 62-65, 2003.

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

SCHALM, G. N.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 130, p. 199 –204, 1957.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet. Microbiol.*, v. 101, n. 2, p. 101-107, 2004.

SCHLEGELOVA, J.; DENDIS, M.; BENEDIK, J.; BABAK, V.; RYSANEK, D. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. *Vet. Microbiol.*, v. 92, n. 4, p. 327-334, 2003.

SILVA, M. V. M.; ARAÚJO, K. P. C. Mastite e qualidade do leite. *Rev. Vet. Zootec.*, v. 15, p. 20-23, 2008.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; LAGO, T. B. N.; VEIGA, D. R. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n.1, p. 128-132, 2005.

STRAUB, J. A.; HERTEL, C.; HAMMES, H. P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. [*J. Food Prot.*](#), v. 62, n. 10, p. 1150-1156, 1999.

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. *J. Microbiol.*, v. 44, p. 42-49, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

THOMAS, C. B.; WILLEBERG, P.; JASPER, D. E. Case control study of bovine Mycoplasmal mastitis in California. *Am. J. Vet. Res.*, v. 42, p. 511-515, 1981.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN DER LOGT, J. T.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; QUINT, W. G.; NIESTERS, H. G.; GALAMA, J. M.; MELCHERS, W. J. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, p. 2606-2615, 1992.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Patógenos causadores de mastite bovina em Nova York e Pensilvânia : Prevalência e efeitos sobre a contagem de células somáticas e produção de leite. *J. Dairy Sci.*, v. 80, p. 2592-2598, 1997.

ZADOKS, R. N.; FITZPATRICK, J. L. Changing trends in mastitis. *Ir. Vet. J.*, v. 62, suppl., p. 59-70, 2009.

ZAFALON, L. F.; NADER-FILHO, A.; OLIVEIRA, J. V.; RESENDE, F. D. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 25, n. 3, p. 159-163, 2005.