

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Mycoplasma bovis como agente causal de mastite clínica bovina

NATHÁLIA BRANCATO JUNQUEIRA

Botucatu-SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Mycoplasma bovis como agente causal de mastite clínica bovina

NATHÁLIA BRANCATO JUNQUEIRA

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

Orientador: Prof. Dr. Helio Langoni

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

Junqueira, Nathalia Brancato.

Mycoplasma bovis como agente causal de mastite clínica
bovina / Nathalia Brancato Junqueira. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502000

1. Bovino - Doenças. 2. Micoplasma. 3. Micoplasmose em
animais. 4. Biologia molecular. 5. Mamas - Infecções.

Palavras-chave: Biologia molecular; Infecção mamária;
Micoplasmose; Microbiológico.

Nome do Autor: Nathália Brancato Junqueira

Título: *Mycoplasma bovis* como agente causal de mastite clínica bovina

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Helio Langoni
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Membro
Departamento de Higiene veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP - Botucatu

Dra. Elena Mettifogo
Responsável técnica Laboratti Diagnóstico Veterinário
Membro

Data da Defesa: 7 de agosto de 2017.

**Aos meus pais, Ana e Luís Antônio,
meus irmãos Juliana, Roman, Daniel e Camila,
meus sobrinhos Davi, Anna, Linda, Leonardo e Maria Luísa,
meu noivo, Caio,
com carinho**

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o incentivo e carinho, em especial aos meus pais, Ana e Luís Antônio, que sempre contribuíram para meus estudos e aos meus irmãos, que antes eram só dois e agora trouxeram pessoas maravilhosas para compor nossa família Juliana, Roman, Daniel e Camila por todo o apoio.

Aos meus sobrinhos e afilhados que são a razão de toda a minha saudade e do meu sorrir, Davi, Anna, Linda, Leonardo e Maria Luísa.

Ao meu amor, Caio, por todo o carinho e compreensão, e por sempre estar ao meu lado, me incentivar e apoiar minhas decisões.

Ao meu orientador, Prof. Dr . Hélio Langoni, por toda sua atenção, paciência, dedicação e por todo o conhecimento e oportunidades oferecidas.

Aos meus amigos Gabriela, Anelise, Giulia, Joeleni, Raissa, Marcelinha, Sâmea, Felipe Dalanezi, Felipe Guimarães, Benedito por toda ajuda e incentivo que ofereceram. Obrigada a todos, pelas risadas de todos os dias!

À querida amiga Gabriela que sempre esteve lá, desde o primeiro dia da faculdade, para me ajudar, me incentivar, me fazer rir e por tudo o que me ensinou, obrigada por tudo!

A todos os funcionários do departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública que me apoiaram durante esse trajeto.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Resultados das reações bioquímicas para identificação de <i>Streptococcus</i> isolados de amostras de leite de vacas com mastite clínica.....	16
Tabela 1. Resultados obtidos a partir do cultivo microbiológico convencional, de amostras de leite de vacas com mastite clínica. Botucatu, SP, 2017.....	19
Tabela 2. Patógenos isolados a partir do cultivo microbiológico convencional, de amostras de leite de vacas com mastite clínica. Botucatu, SP, 2017.....	20
Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos no exame microbiológico e molecular para a pesquisa de <i>Mycoplasma</i> spp e <i>M. bovis</i> , a partir de amostras de leite de vacas com mastite clínica. Botucatu, SP, 2017.....	22
Tabela 4. Resultados do exame microbiológico convencional e por PCR (<i>M. bovis</i>) de amostras de leite de vacas com mastite clínica . Botucatu, SP, 2017.....	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição das amostras de leite de vacas com mastite clínica avaliadas, de acordo com o estado de procedência. Botucatu, SP, 2017.....13
- Figura 2.** Colônia em formato de “ovo-frito” sugestiva de *Mycoplasma* spp., isolada de casos de mastites clínicas, observada em microscópio invertido. Botucatu, SP, 2017.....21

LISTA DE ABREVIACÕES

BHI – Caldo cérebro coração

CCS – Contagem de células somáticas

NMC – National Mastitis Council

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PPLO - Micro-organismos semelhantes aos da pleuropneumonia

SCN – *Staphylococcus* coagulase negativa

SCP – *Staphylococcus* coagulase positiva

Subsp. – Subespécie

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. Gênero micoplasma e propriedades gerais.....	6
2.2. Infecções por micoplasmas em animais domésticos.....	7
2.3. Mastite bovina por micoplasma.....	7
2.4. Justificativa.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1. Gerais.....	12
3.2. Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Animais.....	13
4.2. Obtenção das amostras.....	14
4.3. Tamanho do rebanho.....	14
4.4. Cultivo microbiológico convencional.....	14
4.4.1. Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> spp.	15
4.4.2. Isolamento e identificação de <i>Streptococcus</i> spp.	15
4.4.3. Isolamento e identificação de bactérias gram negativas.....	16
4.5. Cultivo microbiológico para isolamento de <i>Mycoplasma</i> spp.	16
4.6. Detecção molecular de <i>Mycoplasma</i> spp. e <i>Mycoplasma bovis</i>	17
4.6.1. Extração de DNA.....	17
4.6.2. Realização da PCR.....	17
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÕES.....	29
8. REFERÊNCIAS.....	30

JUNQUEIRA, N. B. *Mycoplasma bovis* como agente causal de mastite clínica bovina. Botucatu, 2017. 38p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Mycoplasma spp., tem distribuição mundial e é um patógeno relevante em medicina veterinária. As mastites causadas por *Mycoplasma* spp. mais frequentes em grandes rebanhos leiteiros, porém este patógeno é subestimado no Brasil, onde se têm poucos relatos como agente causador de mastite, o que se deve possivelmente a quantidade reduzida de laboratórios que inclui a análise de *M. bovis* em sua rotina. Devido a necessidade de meios seletivos e de condições especiais para o seu isolamento. Diante disso um dos objetivos do presente estudo foi pesquisar a participação de *Mycoplasma bovis* na etiologia das mastites clínicas em amostras de leite de vacas de propriedades leiteiras de sete estados do Brasil, totalizando 561 amostras de leite, que foram cultivadas em meio Hayflick adicionado de acetato de tálio a 0,01%, incubadas em ambiente de microaerofilia com 5% de CO₂. Foram também submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma bovis*. Pesquisou-se também a microbiota aeróbica envolvida nas mastites, cultivando-se as mesmas amostras de leite em meios de ágar sangue bovino 5% e ágar MacConkey resultando 225 amostras positivas. Obtiveram-se 11 (1,96%) amostras positivas para *Mycoplasma* spp., no exame microbiológico, enquanto na detecção molecular obteve-se um total de 17 (3,03%) amostras positivas para *Mycoplasma bovis*. Pode-se concluir com os resultados obtidos pela presença e dispersão do *Mycoplasma bovis* nos rebanhos leiteiros avaliados, apesar de sua prevalência ser menor quando se compara com outros países, e ainda pela participação de outros patógenos aeróbicos com a associação de *Staphylococcus* coagulase negativa (17,6%) e *Streptococcus dysgalactiae* (11,7%) em 29% das amostras positivas para *M. bovis*.

Palavras-chave: Biologia molecular; infecção mamária; microbiológico; micoplasmose.

JUNQUEIRA, N. B. *Mycoplasma bovis* as causal agent of bovine clinical mastitis. Botucatu, 2017. 38p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Mycoplasma spp., has a worldwide occurrence and can cause severe pneumonia in calves and mastitis in lactating cows. The mastitis caused by *Mycoplasma spp.* are relatively common in large dairy herds. This pathogen, however, is still underestimated, especially in Brazil, with few reports of its occurrence as causative agent of mastitis due to small number of laboratories that include the *M. bovis* analysis as part of their routine. Such lack of analysis is due to the fact that such analysis requires selective means and special conditions for its isolation. Therefore, the aim of this study was to research the participation of *Mycoplasma bovis* in the etiology of clinical mastitis of dairy properties of the seven different states from Brazil. A total of 561 milk samples from animals with clinical mastitis were evaluated. The samples were grown on Hayflick broth added of thallium acetate 0.01%, incubated in microaerophilic atmosphere at 5% CO₂. The samples were also subject to molecular evidence polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Mycoplasma spp.* and *Mycoplasma bovis*. The aerobic microbiota involved in the mastitis was also investigated, and the same milk samples were cultured in media of 5% bovine blood and MacConkey agar resulting in 225 positive samples. Colonies of *Mycoplasma spp* were isolated in 11 (1.96%) samples. The 561 milk samples included in this study were subjected to molecular detection for Mollicutes family, from which 17 (3.03%) samples were positive. All identified as positive were reassessed for the molecular diagnosis for *Mycoplasma bovis*. It can be concluded with the results of this research, the presence of *Mycoplasma bovis* in dairy herds evaluated, but with a lower incidence of this pathogen when compared to other countries, and 29% of the positive samples for *M. bovis* were also associated with other aerobic pathogens such as *Staphylococcus coagulase negative* (17.6%) and *Streptococcus dysgalactiae* (11.7%).

Key words: Molecular diagnosis; mammary infection; microbiological; mycoplasmosis.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite no mundo ocupando a quarta posição no ranking mundial, com uma produção de 35 bilhões de litros de leite fluído no ano de 2014 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016). O país vem apresentando taxas de crescimento populacional e consequente aumento da demanda láctea interna. Desde 2004, a produção láctea brasileira atingiu a autossuficiência e se tornou um país exportador desta matéria prima (BOSISIO et al., 2008).

Estima-se que a produção de leite brasileira envolva 22 milhões de vacas, em sua maioria mestiças, não especializadas, principalmente caracterizada por pequenos produtores, caracterizando-se com uma baixa produtividade com aproximadamente 1.340 (L/vaca/ano), e baixa qualidade do produto final (ZOCCAL & GOMES, 2005).

Além do leite ser fundamental na economia brasileira, devido a sua importante geração de renda e emprego no campo, o produto também é considerado essencial para a população, por ser um alimento de alto valor nutritivo e essencial em diversas fases da vida (ZOCCAL & GOMES, 2005). Portanto ressalta-se a necessidade deste alimento exercer sua função nutricional de forma segura, ou seja, com ausência de patógenos que apresentem risco a saúde dos consumidores e que mantenham as suas características organolépticas (FONSECA, 2013).

A mastite bovina é a causa de um dos maiores prejuízos na produção leiteira. Este prejuízo pode ocorrer tanto pela queda na produção láctea, perda da qualidade do leite e até perda da função de quartos mamários infectados (RIBEIRO et al, 2003; LANGONI, 2013; RIBEIRO et al., 2016). Esta enfermidade tem por características um processo inflamatório da glândula mamária relacionadas a agressões físicas, químicas, térmicas ou microbianas (TOZZETTI et al., 2008). Está relacionada com o manejo sanitário desenvolvido na propriedade leiteira, tanto com relação aos animais bem como o manejo ambiental, como em salas de ordenha e piquetes (DOMINGUES & LANGONI, 2001).

A origem do processo inflamatório na glândula mamária, segundo PHILPOT & NICKERSON (1991) em 90% dos casos está associada a infecções bacterianas. Portanto, além das perdas econômicas na qualidade e produção de leite, também deve-se enfatizar os riscos à saúde pública decorrentes das mastites, devido a 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; DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

A mastite é subdividida convencionalmente em clínica e subclínica. A mastite clínica apresenta sinais evidentes no leite (pus, sangue, dessora, grumos), no úbere (edema, hipertermia, rubor, sensibilidade à palpação), e podendo apresentar sinais sistêmicos. Na mastite subclínica, não se observam alterações macroscópicas no leite ou sinais de inflamação da glândula mamária, porém ocorrem alterações na composição físico-química do leite, queda na produção dos animais acometidos, bem como o aumento da contagem de células somáticas (CCS) (RIBEIRO et al, 2016).

No Brasil, a mastite subclínica é de extrema importância econômica, devido sua alta prevalência. Em trabalhos regionais foi relatada uma prevalência entre 34 e 68% (BUENO et al., 2006, FERREIRA et al., 2007), e queda na produção de leite de 25,4% a 43,0% (BRANT & FIGUEIREDO, 1994). Já a mastite clínica representa 18% do prejuízo total, por causar morte, descarte prematuro (DU PREEZ & GIESECKE, 1994), além de gastos veterinários, medicamentos e descarte de leite.

A etiologia da mastite é complexa e multivariada, já tendo sido descrita na literatura 137 espécies de micro-organismos, de 35 diferentes gêneros causadores (WATTS, 1988). Desta maneira faz-se necessária a identificação do micro-organismo causador da patologia para o efetivo controle.

Os principais agentes contagiosos em nível mundial de mastite bovina são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (LANGONI et al.,1998; JAYARAO et al., 2003; DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013).

A primeira identificação de *Mycoplasma* spp. ocorreu em 1898, nomeado *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, causador da pleuropneumonia contagiosa bovina e, subsequentemente, os tipos semelhantes de micoplasmas foram chamados de micro-organismos semelhantes aos da pleuropneumonia (PPLO) (QUINN et al., 2011).

A bactéria *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) necessita de meios e condições especiais para o desenvolvimento, dificultando o seu diagnóstico. Desta maneira é possível que tal patógeno possa ser subdiagnosticado no Brasil, uma vez que poucos laboratórios incluem a sua análise na rotina microbiológica. Devido a alta contagiosidade desse patógeno faz-se necessário investigações nos rebanhos no país, para se evitar a transmissão e prejuízos em rebanhos leiteiros, uma vez que não há tratamento eficaz para o seu controle. Neste contexto, o presente estudo visou

principalmente identificar a participação deste patógeno na etiologia das mastites clínicas em propriedades leiteiras de diversos estados do Brasil, bem como pesquisar a microbiota aeróbica envolvida na etiologia das mastites.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero micoplasma e propriedades gerais

Os micoplasmas pertencem a classe *Mollicutes*, gênero *Mycoplasma*, e tais micro-organismos se diferem de outras bactérias pela ausência de parede celular rígida. São células delimitadas apenas pela unidade trilaminar da membrana (RAZIN et al., 1998). Assim, são altamente pleomórficos, e capazes de produzir filamentos que parecem fungos, fato que originou o seu nome (*mykes* = fungo e *plasma* = formato) (TORTORA et al., 2012).

As células do gênero *Mycoplasma* são bem pequenas, variando de 0,1 a 0,25µm, com um volume celular que representa em torno de 5% do volume de um bacilo típico. Devido ao seu tamanho e plasticidade sua passagem é possível por meio dos filtros que retêm bactérias comuns, sendo assim estes organismos foram inicialmente considerados como vírus (TORTORA et al., 2012).

A ausência de parede celular bacteriana típica, contendo peptideoglicano, torna estes micro-organismos insensíveis aos agentes antimicrobianos contra parede celular, como as penicilinas e cefalosporinas. Todavia, são suscetíveis à dessecação, ao aquecimento, a detergentes e desinfetantes comuns (ROSENBUSCH, 1994).

Os micro-organismos do gênero *Mycoplasma* são considerados os menores organismos autoreplicáveis capazes de sobreviver como células livres (TORTORA et al., 2012), e possuem capacidade limitada de realizar biossíntese. Portanto, o cultivo de micoplasmas exige meios enriquecidos contendo precursores desta biossíntese. A alta virulência de algumas espécies de micoplasmas, como *M. bovis*, pode estar associada a capacidade deste patógeno de inibir a ação de neutrófilos no hospedeiro, prejudicando a ação da imunidade inata do organismo afetado (GONDAIRA et al., 2017).

A maioria dos micoplasmas é anaeróbia facultativa, embora algumas espécies possam ser isoladas em condições de microaerofilia entre 5 e 10% de CO₂ (QUINN et al., 2011). As colônias têm menos de 1mm de diâmetro e aparência típica de “ovo frito” quando vistas a microscopia sob luz transmitida (TORTORA et al., 2012).

Nas últimas décadas como alternativa aos métodos convencionais de detecção de micoplasmas tem sido utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR), que é um método acurado, de alta sensibilidade e especificidade para detecção de *Mycoplasma* spp. em amostras de leite (GHADERSOHI, 1997; BAIRD, 1999; RIFFON, 2001; SUNG, 2006), possibilitando um diagnóstico rápido, e prevenção de possíveis surtos de

mastites causadas por micoplasma. Diversos estudos têm demonstrado a eficácia da PCR para a detecção de *Mycoplasma* spp. (CARDOSO, 2000; JUSTICE-ALLEN et al., 2011).

2.2. Infecções por micoplasmas em animais domésticos

Micro-organismos do gênero *Mycoplasma* tem distribuição mundial e podem causar diversas enfermidades nos animais de produção.

Entre as importantes doenças que acometem caprinos e ovinos, as infecções micoplasmáticas resultam perdas significativas, na qual morbidade e mortalidade em alguns casos podem atingir 100% do rebanho. As principais enfermidades são causadas pelas espécies *M. agalactiae*, *M. capricolum*, *M. ceratoconjunctivae*, *M. mycoides subsp. capri*, causando agalaxia contagiosa, poliartrites, ceratoconjuntivites, pleuropneumonia contagiosa, entre outras (DAMASSA et al., 1992).

Na avicultura o *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* são responsáveis por grandes prejuízos econômicos, sendo o *M. gallisepticum* o agente etiológico causador da doença respiratória crônica das galinhas e sinusite infecciosa dos perus (NACIMENTO, 2000) e o *Mycoplasma synoviae* como agente causador de doenças crônicas endêmicas que são transmitidos verticalmente, através de ovos contaminados, sendo altamente patogênicos e de difícil erradicação (LAURIMAR, 2005).

Na suinocultura a micoplasmose também é responsável por causar importantes enfermidades, como pneumonia enzoótica suína e artrites que podem atingir a membrana sinovial em casos crônicos da doença. As principais espécies descritas na literatura são *M. hyopneumoniae* e *M. hyosynoviae* (KOBISCH & FRIIS, 1996).

Já na bovinocultura os micoplasmas podem causar grave pneumonia em bezerros, mastites em vacas lactantes e poliartrites (PFÜTZNER & SACHSE, 1996). Esse micro-organismo já foi também associado a ceratoconjuntivite (KIRBY & NICHOLAS, 1996), endometrites, salpingites, otites, abortamentos e vesiculite seminal, as quais todas foram reproduzidas experimentalmente (RUHNKE, 1994).

2.3. Mastite bovina por micoplasma

As mastites causadas pelos patógenos do gênero *Mycoplasma* spp. são relativamente comuns em grandes rebanhos leiteiros (PFÜTZNER & SACHSE, 1996). Entretanto, provavelmente o diagnóstico deste patógeno é subestimado (NICHOLAS & AYLING,

2003), principalmente no Brasil, onde a literatura está praticamente restrita a relatos de sua ocorrência como agente causador de mastites.

Apesar de várias espécies de *Mycoplasma* spp. já terem sido isoladas em surtos de mastite bovina, *M. bovis* é o patógeno de maior importância (GONZÁLEZ & WILSON, 2003), em virtude da maior patogenicidade e prevalência nos rebanhos (BUSHNELL, 1984; GRAND et al., 1997).

M. bovis pode causar mastites clínicas, subclínicas ou crônicas. Convencionalmente é considerado patógeno contagioso, embora a evolução da afecção se assemelha ao padrão de patógenos ambientais, com surtos clínicos da doença (BRAMLEY, 1992). Uma vez que a mastite por *Mycoplasma* se estabelece, o animal afetado pode eliminar de 10^6 a 10^8 UFC por mL de leite, contaminando assim a ordenhadeira, as mãos do ordenhador, luvas de látex e demais utensílios, que se tornam importantes vias de transmissão para outros animais do rebanho (BUSHNELL, 1984; GONZALEZ & WILSON, 2003; BYRNE et al., 2005).

Os sinais clínicos da mastite causada por *M. bovis* incluem agalaxia em mais de um quarto mamário, e aumento de casos que não respondem ao tratamento. Os animais se apresentam saudáveis apesar da mastite grave. O leite apresenta sedimento, semelhante a areia (PRETTO et al., 2001). Além da infecção mamária outros sinais clínicos atípicos podem ser observados, incluindo claudicação, edema dos membros anteriores, poliartrites (WILSON et al., 2007) e emagrecimento progressivo.

A introdução do agente em rebanhos livres ocorre geralmente pela aquisição de bezerros ou novilhas clinicamente saudáveis na propriedade, que podem ser portadoras de *M. bovis* e uma vez introduzido o patógeno, em qualquer categoria animal, torna-se difícil a erradicação (GOURLAY et al., 1989). Um animal com mastite clínica positiva para *M. bovis* pode ser responsável por desencadear até um episódio de infecções, em lote livre do patógeno (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2011).

Os bezerros podem manter *M. bovis* no trato respiratório por diversos meses ou até anos, servindo como reservatório do patógeno (PFUTZNER, 1990; FOX et al., 2005).

A disseminação do agente no organismo do animal, pode ser sistêmica afetando o pulmão ou outros órgãos e posteriormente, via sanguínea alcança a glândula mamária (FOX et al., 2003; 2005).

A transmissão do *M. bovis* pode ocorrer durante a ordenha, na qual animais com micoplasmose mamária são ordenhados no mesmo lote de animais saudáveis, devido ao elevado número de UFC liberados por mL de leite provenientes da glândula mamária

afetada (BIDDLE et al., 2003). Alternativamente, o contato entre animais, por meio das vias respiratórias, canal dos tetos, trato genital, incluindo até inseminação artificial com sêmen contaminado, também são vias de transmissão (PFUTZNER, 1990).

Punyapornwithaya et al. (2010) investigaram, por meio de swabs, a presença de estirpes de *M. bovis* nas mucosas da cavidade nasal, fossa vestibular e parede vaginal de todos os animais do rebanho e quando encontradas, tais estirpes foram comparadas as encontradas em mastites causadas por *M. bovis* no mesmo rebanho. Tal estudo revelou que as mesmas estirpes encontradas nos swabs de animais saudáveis foram as causadoras de mastite no rebanho porém, curiosamente, os animais mastíticos foram negativos para *M. bovis* em suas cavidades nasais, fossas vestibulares e paredes vaginais. É possível afirmar que a transmissão deste agente no rebanho possa ocorrer de outras maneiras além da via sistêmica e também pela transmissão de um animal para outro durante o processo de ordenha.

A taxa de incidência das infecções micoplasmáticas são determinadas pela virulência da estirpe, dose infectante e tempo de exposição ao patógeno, podendo os animais infectados desenvolver diferentes enfermidades como pneumonia, artrose ou a própria mastite (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2011).

Para o controle das mastites por *M. bovis* torna-se necessário a detecção de animais infectados e a sua segregação ou eliminação. Simultaneamente devem ser realizadas 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 do equipamento de ordenha (GUNNING & SHEPHERD, 1996).

As perdas econômicas registradas nos EUA, por mastites causadas por *M. bovis*, são estimadas em até \$108 milhões de dólares por ano com níveis de até 70% dos rebanhos infectados (ROSENGARTEN & CITTI, 1999). Por outro lado, em muitos países, é um patógeno subestimado, devido a quantidade reduzida de laboratórios que incluem a análise de *M. bovis* em sua rotina (NICHOLAS & AYLING, 2003), decorrente, principalmente, da necessidade de meios seletivos e de condições especiais de microaerofilia para o isolamento.

A partir de um surto de mastite bovina, em 1961, *M. bovis* foi isolado pela primeira vez, nos Estados Unidos (HALE et al., 1962), tendo sido inicialmente diagnosticado como *M. bovimastitidis*. Apenas em 1976, após diversos estudos baseados em técnicas moleculares, foi classificado como *M. bovis* (ASKAA & ERNØ, 1976).

Devido ao grande trânsito de animais (NICHOLAS & AYLING, 2003), *M. bovis* tem sido descrito em diversos países, como Israel (1964), Espanha (1967), Austrália (1970), França (1974), Inglaterra (1975), Checoslováquia (1975), Alemanha (1977), Dinamarca (1981), Suíça (1983), Marrocos (1988), Coreia do Sul (1989), Irlanda do Norte (1993), República da Irlanda (1994), Chile (2000) (NICHOLAS, 2002), Japão (2000) (MAEDA et al., 2003), Grécia (FILIOUSSIS et al., 2007), Bósnia Herzegovina (RIFATBEGOVIC et al., 2007) e Itália (RADAELLI et al., 2008), fato que confirma a grande dispersão do agente em todo o mundo.

No Brasil, a primeira citação de casos de mastite bovina por esse agente foi descrita por Mettifogo et al. (1996), na região de Londrina-PR, alertando para a presença do patógeno na etiologia da mastite no país. Pretto et al. (2001), descreveram subsequentemente o micro-organismo na região norte do Paraná e sudoeste do Estado de São Paulo, investigando 713 animais provenientes de três propriedades leiteiras. Do total de animais 137 que apresentavam mastite, dos quais oito (5,83%) eram causadas por *M. bovis*.

Franceschini et al. (2008) pesquisaram a participação de micoplasmas em amostras de leite de vacas com mastite subclínicas e clínicas de três propriedades leiteiras da região centro-oeste de São Paulo. Das 101 e 121 amostras provenientes de mastite clínica aguda e subclínica, respectivamente, avaliadas tanto microbiologicamente por cultura em meio de Hayflick e por PCR, utilizando primers gênero específico, todas revelaram resultado negativo.

Em diferentes países a prevalência de mastite causada por *M. bovis* varia entre 0,5 a 35% (GONZÁLEZ & WILSON, 2003; FOX et al., 2005). Tal variação da prevalência pode ser atribuída às necessidades especiais requeridas para a cultura e isolamento de micoplasma. Assim a identificação desse agente, tanto nas mastites como em outras patologias dos sistemas respiratório, urogenital, articulações, sistema nervoso e conjuntiva ocular têm sido pouco frequentes no Brasil (BUZINHANI et al., 2007).

Além da PCR tradicional, segundo Justice-Allen et al. (2011), outro procedimento que pode ser utilizado para diagnóstico da infecção é a PCR em tempo real que possibilita a identificação qualitativa e quantitativa das espécies de *Mycoplasma* em uma mesma amostra de leite, pela análise da temperatura de dissociação. Este é um aspecto vantajoso, diante das limitações do diagnóstico microbiológico.

Na prática, suspeita-se de micoplasmose mamária quando sucessivas amostras de leite de vaca com mastite revelam-se negativas nas culturas realizadas pelos métodos

microbiológicos padrões (PHILPOT & NICKERSON, 2002), provavelmente devido as exigências do agente com relação ao isolamento microbiano.

A PCR pode ser utilizada para o monitoramento da qualidade do leite, principalmente nos casos de grandes rebanhos, possibilitando a avaliação de diferentes patógenos pela utilização da Multiplex PCR (TRONCARELLI et al., 2015).

O monitoramento de micro-organismos a partir de amostras de leite de tanque de expansão possibilita a adoção de medidas de controle nos rebanhos. A identificação de determinado agente infeccioso nessas situações indica possivelmente a participação nas mastites subclínicas e, a partir desse resultado é possível pesquisá-los em amostras compostas de leite dos tetos de um mesmo animal orientando para o descarte principalmente no caso de *Staphylococcus aureus* e *M. bovis*, já que as perspectivas de êxito no tratamento são baixas principalmente por micoplasmas (HOULIHAN et al., 2007).

Apesar dos custos referentes à utilização da PCR na rotina diagnóstica, com as novas tecnologias e as possibilidades de importação, tem-se conseguido menor preço sendo factível em muitas situações a utilização das técnicas moleculares não somente para pesquisa, mas também para o diagnóstico. Especificamente no que se refere a *Mycoplasma* spp. indubitavelmente são ferramentas que devem ser exploradas, considerando-se os aspectos já levantados com relação às limitações do diagnóstico microbiológico desse agente (METTIFOGO & TAMASO, 2013).

2.4. Outros patógenos na etiologia das mastites

Anteriormente já foi relatada a ampla variedade de micro-organismos causadores de mastites (WATTS, 1988). A literatura nacional e internacional é muito rica, havendo muitas pesquisas nesse sentido.

De maneira geral, merecem destaque as infecções mamárias por *Staphylococcus aureus* (GIANNEECHINI et al., 2002; OLDE RIEKERINK et al., 2008; UNNERSTAD et al., 2009), *Staphylococcus* coagulase negativa (UNNERSTAD et al., 2009; DE FREITAS GUIMARÃES et al., 2013), *Streptococcus agalactiae* (UNNERSTAD et al., 2009), *Trueperella pyogenes* (UNNERSTAD et al., 2009) e *Corynebacterium bovis* (GREEN et al., 2002) como micro-organismos contagiosos.

Como agentes causadores de mastites considerados ambientais predominam *Streptococcus dysgalactiae* (UNNERSTAD et al., 2009), *Streptococcus uberis* (BRADLEY et al., 2007; OLDE RIEKERINK et al., 2008), *Escherichia coli*

(BRADLEY et al., 2007; OLDE RIEKERINK et al., 2008), *Klebsiella pneumoniae* (MUNOZ et al., 2006; PAULIN-CURLEE et al., 2007), *Enterococcus* spp. (JACKSON et al., 2011), além de outros como leveduras (COSTA et al., 2008) e algas (JÁNOSI et al., 2001).

2.5. Justificativa

Considerando o provável subdiagnóstico da micoplasmose mamária bovina no Brasil, as dificuldades de tratamento do agente e aspectos de saúde pública foi proposto o presente estudo com intuito de detectar espécies de micoplasmas em leite de vacas com mastites clínicas. Aproveitando-se as amostras de leite, estudou-se ainda aspectos da microbiota aeróbica envolvida nessa afecção.

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Pesquisar a presença de *M. bovis* e de outras espécies de micoplasmas em casos de mastite clínica bovina, em amostras de leite procedentes de diferentes propriedades, bem como avaliar a microbiota aeróbica de maior frequência dos casos de mastites bovinas no Brasil.

3.2. Específicos

- Comparar o cultivo microbiológico com meios seletivos e a PCR direta na identificação das espécies de micoplasma;
- Investigar a frequência das principais espécies de micoplasmas em casos clínicos de mastite em diferentes estados do Brasil.
- Avaliar a participação de outros micro-organismos envolvidos na etiologia das mastites

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizadas 561 amostras de leite colhidas por conveniência, provenientes de vacas com mastite clínica, procedentes de 39 propriedades leiteiras dos estados de Ceará, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (Figura 1), recebidas pelo Núcleo de Pesquisa em Mastites (NUPEMAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Botucatu, São Paulo, de acordo com a seguinte distribuição de amostras: Ceará 1,42% (8/561), Goiás 6,41% (36/561), Minas Gerais 39% (219/561), Paraná 12,12% (68/561), Rio Grande do Sul 1,96% (11/561), Rio de Janeiro 1,06% (6/561), e São Paulo 37,96% (213/561) (Figura 1).

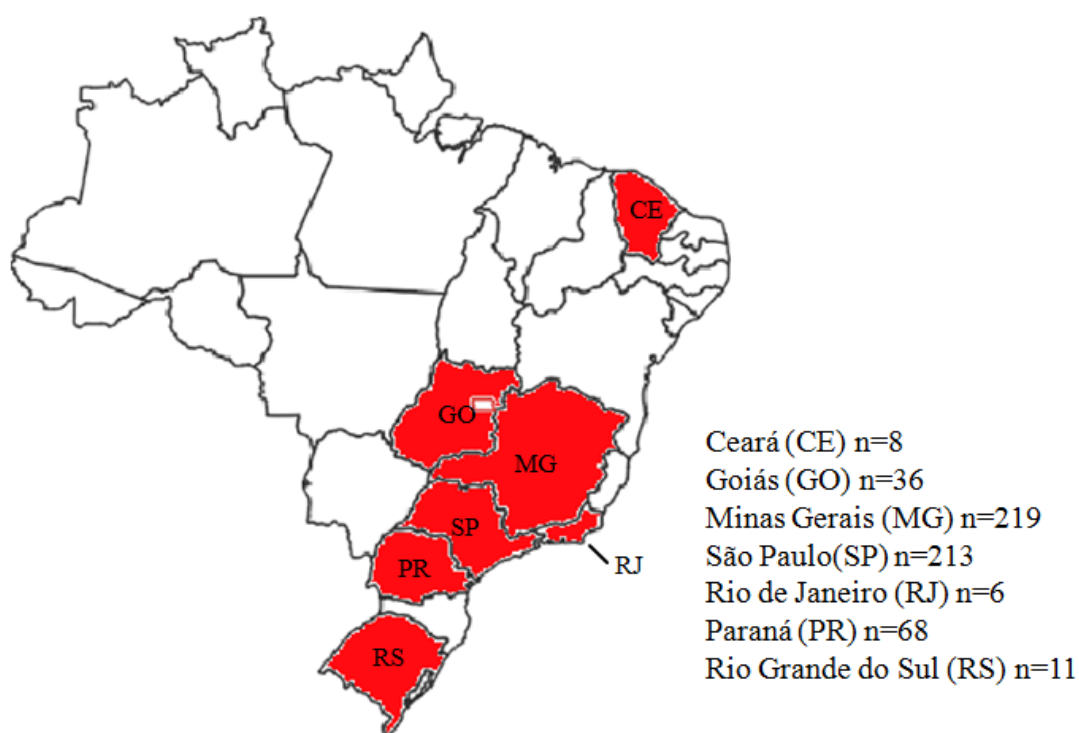


Figura 1. Distribuição da origem das amostras de leite de vacas com mastite clínica cultivadas para a presença de micoplasmas, bem como de outros patógenos, segundo o estado de procedência. Botucatu, SP, 2017

Para determinação do número de amostras foi utilizada uma prevalência estimada de 5% de *M. bovis* em rebanhos leiteiros, com base em estudos de outros países (FOX et al., 2005) e com um intervalo de confiança de 95% (DEAN et al., 2013) que resultou na colheita de um mínimo de 73 amostras de leite, independente do local de origem.

4.2. Tamanho do rebanho:

Com relação ao número de animais por propriedade, os rebanhos utilizados foram divididos em três categorias: rebanho com menos de 100 animais em lactação foi considerado um rebanho pequeno, rebanhos com 350 a 101 animais foi considerado um rebanho médio e rebanhos com mais de 351 animais em lactação foi considerado um rebanho grande (THOMAS et al., 1981).

4.3. Obtenção das amostras:

Previamente à coleta de leite foi realizada a lavagem com água, secagem com papel toalha descartável e antissepsia do óstio do teto com solução de álcool iodado a 0,25%. A seguir foram colhidas amostras de 10 mL de leite, em frascos estéreis, para a realização de exame microbiológico, bem como para avaliação molecular da presença de *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma bovis*, de acordo com NMC (1999). Inicialmente as amostras foram congeladas por um período de sete dias e, a seguir, transportadas para o laboratório sob temperatura de refrigeração (4-8°C), em caixa de material isotérmico contendo gelo reciclável.

A obtenção das amostras foi procedida por pessoas treinadas e capacitadas, e enviadas para um laboratório particular localizado na cidade de Botucatu, SP, para diagnóstico microbiológico convencional e, em seguida, encaminhadas ao 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, para a pesquisa específica de *M. bovis* e outras espécies de micoplasmas.

Apesar do cultivo do leite no laboratório supracitado, foi realizado novamente o cultivo microbiológico convencional no NUPEMAS, para identificação da etiologia de outros patógenos envolvidos na etiologia das mastites.

4.4. Cultivo microbiológico convencional

As amostras (0,1mL) foram semeadas em meio ágar-sangue bovino a 5% e ágar McConkey e incubadas em condições de aerobiose a 37°C, com visualização do desenvolvimento microbiano após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os micro-organismos isolados foram submetidos a coloração pelo método de Gram, bem como a identificação por diferentes provas bioquímicas de acordo com Murray et al. (2007). As

amostras foram consideradas contaminadas quando apresentavam mais de três tipos diferentes de colônias (NMC, 1999).

4.4.1. Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

As colônias foram selecionadas, segundo suas características fenotípicas e morfológicas. Levou-se em consideração colônias com tamanho aproximado de 2 a 3 mm de diâmetro, coloração branca a amarelo dourado, hemolíticas ou não (QUINN et al., 2011). As colônias suspeitas foram repicadas para verificação morfológica pela coloração pelo método de Gram (TORTORA et al., 2012). Realizou-se a pesquisa de produção da catalase (SILVA et al., 2001). Foram considerados como *Staphylococcus* spp. os isolados que apresentaram morfologia típica de cocos Gram positivos, agrupados em cachos com a produção da enzima catalase.

Isolados presumivelmente identificados como estafilococos foram submetidos a prova da coagulase e foram categorizados em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). Para realização da prova de coagulase, pipetou-se 0,2mL de cada cultura obtida em caldo BHI para tubo de ensaio, adicionou-se 0,5mL de plasma de coelho com ácido etileno diamino tetrácetico-EDTA (Laborclin®), incubando-se a 37°C, por 24 horas (SILVA et al., 2001), para avaliação do resultado.

Apenas os SCP foram submetidos as demais provas bioquímicas, incluindo fermentação dos açúcares trealose, manitol, maltose e sensibilidade ou resistência à polimixina B (300 UI) (KONEMAN et al., 1997) e a novobiocina. Após a identificação das espécies, os isolados foram conservados em criotubos contendo caldo cérebro-coração e glicerol a -80°C.

4.4.2. Isolamento e identificação de *Streptococcus* spp.

Colônias pequenas, ao redor de 0,5 mm de diâmetro, translúcidas, apresentando hemólise ou não, foram classificadas pelas provas da hidrólise da esculina, bile esculina e CAMP-test. A interpretação foi realizada de acordo com Quinn et al. (2011) (Quadro 1).

Quadro 1. Resultados das reações bioquímicas para identificação de *Streptococcus* e *Enterococcus faecalis* isolados de amostras de leite de vacas com mastite clínica.

	Camp test*	Hidrólise da esculina	Bile esculina
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+	-	-
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>	-	+	-
<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	+

* com *Staphylococcus aureus*

Fonte: Quinn et al. (2011) adaptado.

4.4.3. Isolamento e identificação de bactérias Gram negativas

As linhagens bacterianas isoladas em ágar MacConkey foram submetidas às provas bioquímicas para enterobactérias utilizando meios de cultura sólidos e semi-sólidos, distribuídos em tubos de ensaio, visando determinar os seguintes parâmetros: produção de gás (glicose), H₂S, urease, L-TD, motilidade, indol, lisina e citrato de Simmons (SILVA et al., 2001).

4.5. Cultivo microbiológico para isolamento de *Mycoplasma* spp.

Para isolamento de *Mycoplasma* spp. foi realizada previamente a padronização de técnicas de cultivo a partir de amostras de leite bovino, tendo se estabelecido o seguinte protocolo: cultivo de 0,05mL de cada amostra em placas de Petri contendo meio sólido Hayflick suplementado, conforme descrito por Whitford (1994) e acrescido de acetato de tálio a 0,01% como fator seletivo (GONZÁLEZ & WILSON, 2003). 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 cada três dias, pela observação das placas de cultivo em lupa, considerando-se como positivas aquelas com presença de colônias de aspecto característico de “ovo-frito” (PRETTO et al., 2001). Para cada caso de isolamento positivo, anotou-se o período para o desenvolvimento das colônias em protocolos utilizados para a pesquisa.

4.6. Detecção molecular de *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma bovis*

4.6.1. Extração do DNA

Aliquotas de 1,5mL das amostras de leite foram mantidas em microtubos DNAs free, congeladas a -80°C até o momento da extração do material genético microbiano, e descongeladas previamente em temperatura ambiente, até atingirem aproximadamente 20°C. A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit comercial Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin® (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), com algumas adaptações previamente padronizadas no laboratório de biologia molecular aplicada ao diagnóstico de zoonoses – UNESP- Botucatu-SP, utilizando-se 200µL de leite de cada amostra.

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

Desprezou-se o tubo coletor, colocando-se a coluna em microtubo de 1,5mL (DNase-free), adicionando-se em seguida 200µL do tampão de eluição (70°C), mantendo-se por um minuto a temperatura ambiente e centrifugou-se a 11000g por 1 minuto. As amostras foram mantidas em geladeira (4°C) por 24 horas, seguido do congelamento a -20°. A quantificação foi realizada pela corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% com marcadores *low mass* DNA (invitrogen).

4.6.2. Realização da PCR

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-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 (VAN KUPPEVELD et al., 1992) e perfil de ciclos como segue: 5 min a 94°C, 35 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 *M. bovis* com o uso dos primers específicos MBOr (5' CCG TCA AGG TAG CAT CAT TTC CTA T 3') e MBOF (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 3 minutos, 35 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 3 minutos.

A visualização do material amplificado foi avaliada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,06µL/mL de Nancy (sigma). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) em voltagem 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).

5. RESULTADOS

A partir do cultivo microbiológico convencional, em condições aeróbicas na ausência de CO₂, encontrou-se prevalência de 47,4% (n=266) amostras negativas (sem desenvolvimento microbiano), 5% (n=28) outros, 7,5% (n=42) contaminadas, 2,7% (n=15) coinfeção e 37,4% (n=210) amostras positivas com o isolamento de apenas um patógeno como possível causador da infecção (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados obtidos a partir do cultivo microbiológico convencional, de amostras de leite de vacas com mastite clínica. Botucatu, SP, 2017.

Resultado	Número de amostras
Negativo	47,4% (n=266)
Outros patógenos	5% (n=28)
Isolamento de um patógeno	37,4% (n=210)
Isolamento de dois patógenos	2,7% (n=15)
Isolamento de três ou mais patógenos	7,5% (n=42)
Total	100% (n=561)

Das 225 amostras positivas no cultivo microbiológico convencional foram isolados: *Streptococcus agalactiae* 7,5% (n=17), *Streptococcus* não *agalactiae* 27,1% (n=61), micro-organismos Gram negativos 23,1% (n=52), *Staphylococcus aureus* 4% (n=9), *Staphylococcus* spp. 14,2% (n=32), infecções mistas 6,6% (n=15), *Enterococcus* spp. 5,7% (n=13), *Corynebacterium* spp. 5,7% (n=13), leveduras 2,6% (n=6), *Prototheca* spp. 1,3% (n=3), *Pasteurella* spp. 0,8% (n=2), *Trueperella pyogenes* 0,44% (n=1) e *Pseudomonas* spp. 0,44% (n=1) (Tabela 2).

Tabela 2. Patógenos isolados a partir do cultivo microbiológico convencional, de amostras de leite de vacas com mastite clínica. Botucatu, SP, 2017.

Patógeno		Número de amostras
<i>Streptococcus</i>	<i>agalactiae</i>	7,5% (n=17)
34,6% (n=78)	Não <i>agalactiae</i> (<i>S. uberis</i> e <i>S. dysgalactiae</i>)	27,1% (n=61)
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	4%(n=9)
18,2% (n=41)	<i>S. coagulase</i> negativa, <i>S. intermedius</i> e <i>S. hyicus</i>	14,2% (n=32)
Gram negativos	<i>Escherichia coli</i>	16,88%(n=38)
23,1% (n=52)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,7%(n=4)
	<i>Serratia rubideae</i>	1,33%(n=3)
	<i>Hafnia alvei</i>	0,88% (n=2)
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,88%(n=2)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,44%(n=1)
	<i>Citrobacter freundii</i>	0,44%(n=1)
	<i>Serratia marcescens</i>	0,44%(n=1)
	Infecções mistas	6,6% (n=15)
	<i>Enterococcus</i> spp.	5,7% (n=13)
	<i>Corynebacterium</i> spp.	5,7% (n=13)
	Leveduras	2,6% (n=6)
	<i>Prototheca</i> spp.	1,3% (n=3)
	<i>Pasteurella</i> spp.	0,8% (n=2)
	<i>Trueperella pyogenes</i>	0,44% (n=1)
	<i>Pseudomonas</i> spp.	0,44% (n=1).
TOTAL		100% (n=225)

No meio de cultura específico para o isolamento de micoplasmas, das 561 amostras cultivadas, foram observadas colônias sugestivas do agente em 11 (1,96%) das amostras de leite. As colônias foram observadas em microscópio invertido, a partir do terceiro dia de cultivo, a cada três dias até completar um total de 15 dias. A partir do

terceiro dia, em 9 das 11 amostras positivas já era possível a observação de colônias características em formato de “ovo frito” (Figura 2). Nas demais amostras (n=2), as colônias só foram observadas a partir do sexto dia de incubação, notando-se isolamento mais lento, o que é também compatível com esse gênero microbiano (CAI et al., 2005).

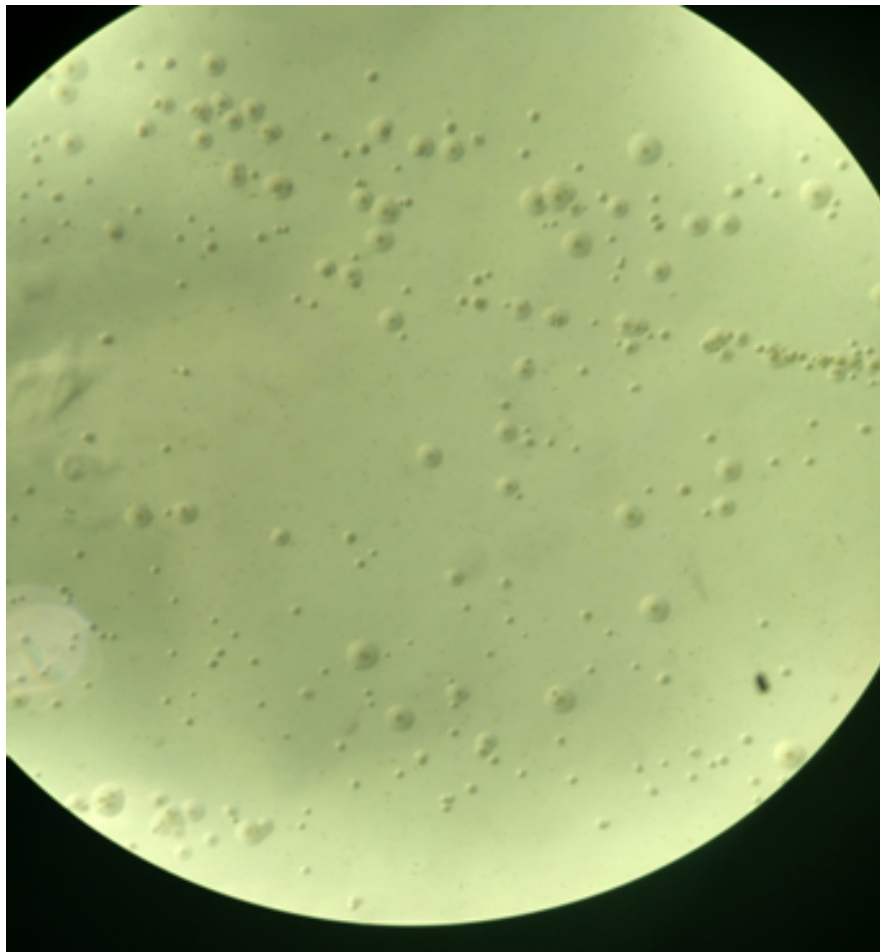


Figura 2. Colônia com aspecto de “ovo-frito”, de *Mycoplasma* spp., isolada de casos de mastites clínicas, em vacas, observada em lupa. Botucatu, SP, 2017.

Todas as amostras de leite incluídas no presente estudo (561), foram submetidas a detecção molecular para classe *Mollicutes*, encontrando-se 17 (3,03%) amostras positivas. As amostras positivas para classe *Mollicutes* foram reavaliadas, utilizando-se primer específico para a detecção de *Mycoplasma bovis*, e as 17 foram positivas, das quais 35,2% (n=6) provenientes do estado do Paraná, 29,4% (n=5) do estado de São Paulo, 17,6% (n=3) de Minas Gerais e 17,64% (n=3) de Goiás. A comparação dos resultados obtidos com os dois métodos de diagnóstico encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação dos resultados obtidos no exame microbiológico e molecular para a pesquisa de *Mycoplasma* spp e *Mycoplasma bovis*, a partir de amostras de leite de vacas com mastite clínica. Botucatu, 2017.

	Cultura Positiva	Cultura Negativa	TOTAL
PCR Positivo	11	6	17
PCR Negativo	0	544	544
TOTAL	11	550	561

Procedentes do estado do Paraná, foram analisadas 68 amostras, das quais seis positivas para *M. bovis*, totalizando 8,8% de prevalência neste estado. Em Goiás, dentre 36 amostras analisadas, três foram positivas para *M. bovis*, com prevalência de 8,3%. No estado de São Paulo, das 213 amostras analisadas, cinco foram positivas para *M. bovis*, com prevalência de 2,3%. Em Minas Gerais, das 219 amostras analisadas, três foram positivas com prevalência de 1,3% para *M. bovis*.

As amostras positivas foram provenientes de seis diferentes propriedades, sendo uma delas considerada de grande produção no estado do Paraná, uma propriedade de média produção do estado de Goiás, duas propriedades do estado de São Paulo, não se tendo informação sobre a produção, outra de alta produção e duas propriedades do estado de Minas Gerais, sendo uma de média produção e da outra não se tem informação. Devido ao tipo de amostragem, por conveniência, não foi possível obter informações do número de animais dos rebanhos em duas propriedades, uma de Minas Gerais, que tiveram duas amostras positivas para *M. bovis* e uma de São Paulo, com uma amostras positiva para *M. bovis*. Quando se fala em volume de produção deve-se entender ou relacionar ao número médio de animais de cada rebanho, que não foi possível definir no estudo.

Dentre as 17 amostras positivas para *M. bovis*, na análise molecular detectou-se coinfeção em cinco amostras de leite, ou seja, obteve-se o isolamento concomitante de outros patógenos, como *Streptococcus dysgalactiae* (n=2) e *Staphylococcus coagulase negativa* (n=3). Três amostras foram consideradas contaminadas no cultivo microbiológico convencional, por terem revelado o isolamento de três ou mais tipos de colônias (NMC, 1999). As demais amostras (n=9) foram positivas somente para *M. bovis* (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados do exame microbiológico convencional e por PCR (*M. bovis*) de amostras de leite de vacas com mastite clínica . Botucatu, SP, 2017.

<i>Mycoplasma bovis</i> por PCR	Microbiológico convencional	Total de amostras (%)
Positivo	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2 (11,7%)
Positivo	<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	3 (17,6%)
Positivo	Três ou mais patógenos (contaminada)	3 (17,6%)
Positivo	Negativo	9 (52,9%)

6. DISCUSSÃO

A micoplasmose mamária no Brasil, devido ao reduzido número de trabalhos científicos, tem sua taxa de prevalência praticamente desconhecida. Com efeito, não é clara a importância da micoplasmose como entidade nosológica nas mastites e os prejuízos ocasionados aos rebanhos leiteiros do país. A literatura nacional se restringe apenas a poucos estudos regionais e relatos de surtos por este patógeno, confirmando-se assim a presença de *M. bovis* como causador de mastites no país. O presente estudo foi elaborado visando investigar o maior número de rebanhos, de diferentes regiões, possibilitando estudo de prevalência mais abrangente. De 561 amostras analisadas, procedentes de sete diferentes estados do Brasil, aproximadamente 3% dos casos de mastites clínicas foram causadas por *M. bovis*.

O primeiro isolamento de *M. bovis* no Brasil, como agente causador de mastite, foi relatado por Mettifogo et al. (1996) na região de Londrina, PR. Mettifogo e Tamasso (2013) relataram surto de mastite causada pelo mesmo patógeno, no estado de Minas Gerais. No presente estudo, foram detectados casos de mastite por *M. bovis* nos dois estados, sendo no Paraná a prevalência de 8,8% e em Minas Gerais de 1,3%.

M. bovis foi descrito por González e Wilson (2003) como a espécie mais frequente do gênero *Mycoplasma* spp. como agente causal de mastites em rebanhos leiteiros, corroborando os resultados obtidos no presente estudo, pois as 17 amostras positivas para a classe *Mollicutes* na PCR foram identificadas como *M. bovis*, fato que reafirma a patogenicidade desta espécie de micoplasma na etiologia das mastites clínicas.

O registro deste patógeno como agente etiológico na mastite é variável em diversos países, sendo descrito entre 0,5 e 55% dos casos (GONZÁLEZ & WILSON, 2003; MIRANDA-MORALES et al., 2009). Essa variabilidade quanto a sua frequência em diferentes países pode estar relacionada às técnicas utilizadas para o diagnóstico, tamanho dos rebanhos, e rotina de cultivo do agente nos laboratórios de apoio diagnóstico (GONZÁLEZ & WILSON, 2003).

No presente estudo, encontrou-se prevalência de 3,03% de *M. bovis* como patógeno nas mastites clínicas em bovinos. A variação na prevalência da ocorrência de mastites por esse patógeno foi referida por Thomas et al. (1981) que atribui tal fato ao tamanho dos rebanhos, considerando o risco de um rebanho ser positivo para micoplasma 15 vezes maior nos grandes rebanhos (>350 animais), quando se compara aos rebanhos menores. Tal fato poderia ser explicado por certos fatores de manejo geral e de

profilaxia da mastite adotados na propriedade, que quando executados de forma incorreta, em grandes propriedades leiteiras, principalmente no tocante ao manejo higiênico estabelecido antes e após a ordenha podem favorecer a infecção. Ainda, em grandes rebanhos, a proximidade dos animais ou maiores possibilidades de risco de aquisição de animais, poderiam contribuir para a introdução do patógeno nos rebanhos (DOMINGUES & LANGONI, 2001; LANGONI, 2013).

Deve-se salientar a alta contagiosidade das bactérias do gênero *Mycoplasma*, incluindo-se *M. bovis*, e que as chances de transmissão são facilitadas em rebanhos maiores (THOMAS et al., 1981; FOX et al., 2003). Os aspectos higiênicos durante o processo de ordenha são importantes para se evitar a ocorrência das mastites, especialmente nos casos de patógenos de alta contagiosidade como é o caso de micoplasmas (LANGONI, 2013).

Francoz et al. (2012) em Québec, no Canadá, observaram prevalência de 2,6% deste patógeno em amostras de leite de tanques de expansão. Resultado similar foi encontrado no presente estudo (3,03%), apesar de tratar-se de casos de mastites clínicas. O monitoramento da qualidade do leite com a pesquisa molecular de tanques de expansão é necessário para melhor entendimento da dinâmica da infecção nas propriedades leiteiras devido a possível detecção da presença de micoplasmas, em casos subclínicos e clínicos, nos quais o leite é destinado indevidamente ao tanque de expansão. Desta maneira deve ser realizada uma triagem da propriedade, e caso encontre-se tanques positivos, sugere-se uma avaliação detalhada do rebanho, para evitar a disseminação do patógeno (FOX et al., 2003).

Na região canadense investigada por Francoz et al. (2012) para ocorrência de micoplasmose mamária os rebanhos leiteiros apresentavam, em média, 60 animais (CANADIAN DAIRY INFORMATION CENTER, 2016). No Brasil, a média do tamanho de rebanhos é inferior, com cerca 29 animais (PARANÁ, 2014; ZOCCAL, 2008). Ambas regiões se caracterizam por pequenos rebanhos produtores de leite, sendo assim espera-se menor prevalência de *Mycoplasma* spp. nas mastites já que, de acordo com a literatura, os riscos de infecção são maiores em grandes rebanhos (THOMAS et al., 1981; FOX et al., 2003).

Por outro lado, no Brasil existem regiões que possuem áreas especializadas em produção de leite, com grandes rebanhos e produções mais intensivas que as demais regiões. A título de exemplo, o estado do Paraná é o terceiro maior produtor de leite com inspeção no país, produzindo 2,8 bilhões de litros, representando 11,8% da

produção total de leite inspecionado do Brasil (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016). No presente estudo foi o estado com maior prevalência de *M. bovis* (8,8%), com apenas uma propriedade positiva para o agente. Tal propriedade foi considerada com um rebanho grande, ou seja, mais de 350 animais em lactação, concordando com a hipótese apresentada por Thomas et al. (1981) e Fox et al. (2003) na qual o tamanho do rebanho apresenta fator de risco para a ocorrência de mastite por *M. bovis*.

Preto et al. (2001), no estado do Paraná, relataram prevalência de 5,83% de mastites (clínicas e subclínicas) causadas por *M. bovis*. Esse estado possui regiões com propriedades altamente especializadas para produção leiteira com propriedades com grande número de animais em lactação, fato que favorece o risco de ocorrência de mastite por *Mycoplasma* spp. (THOMAS et al., 1981).

Devido a amostragem de conveniência adotada nesta pesquisa, o sistema de produção das propriedades envolvidas e o tamanho de dois rebanhos positivos para *M. bovis* são desconhecidos, dificultando uma análise detalhada e criação de hipóteses de possíveis fatores de risco que pudessem desencadear a infecção. A preocupação primordial desta pesquisa foi abranger o máximo de propriedades e amostras de leite possíveis para se conhecer a real prevalência deste agente no país, enfatizando-se que o presente estudo é o primeiro desta natureza realizado em tal abrangência no país.

Dentre as seis propriedades positivas para *M. bovis* foi possível avaliar o tamanho do rebanho de 4 propriedades, duas consideradas de tamanho grande (>350 animais em lactação), e duas de tamanho médio (entre 100 e 349 animais em lactação). Pode-se considerar, portanto, que em um país com uma média de tamanho de rebanhos inferior a 29 animais (PARANÁ, 2014; ZOCCAL, 2008) as propriedades positivas para *M. bovis* podem estar expostas aos fatores de risco pontuados por Thomas et al. (1981) e Fox et al (2003).

Os relatos de isolamento de *Mycoplasma* spp. nos EUA também são variáveis. No período de 1992 a 1998 foram relatados surtos de mastite por *M. bovis* em mais de 140 rebanhos leiteiros, no estado de Wisconsin (THOMAS, 1998). No Estado de Utah foi de 7% (WILSON et al., 2009), enquanto no de Washington 20% dos rebanhos foram positivos para *Mycoplasma* spp. (FOX et al., 1993).

A média de tamanho dos rebanhos dos EUA é de 187 animais (USDA, 2012), fato que influenciaria na maior prevalência desse patógeno nas propriedades. Sabe-se que a contagiosidade dos micoplasmas é elevada, e a possibilidade de contágio durante o

processo de ordenha é maior (GONZALES & WILSON, 2003). Deve-se enfatizar que o manejo sanitário animal é de extrema importância para o controle das mastites, incluindo-se as causadas por micoplasmas (LANGONI, 2013).

Há poucos estudos sobre a prevalência deste patógeno nas mastites clínicas. Manzi (2014) encontrou prevalência de 16,4% de *Mycoplasma* spp. em tanques de expansão na região centro-oeste do Estado de São Paulo, diagnosticado pela PCR, obtendo prevalência relativamente maior se comparada a encontrada no presente estudo. No entanto, foram utilizadas amostras de tanques de expansão, enquanto no presente estudo foram investigados casos clínicos de mastite. Tal diferença poderia ser justificada pelo fato de que o patógeno poderia estar causando mastites subclínicas nos rebanhos, possibilitando a detecção no tanque de expansão, pois possivelmente o leite é adicionado ao tanque das propriedades.

Justice-Allen et al. (2011) compararam dois métodos diagnósticos para detecção de *M. bovis*, o cultivo microbiano no meio de Hayflick e o diagnóstico molecular pela PCR. Foram analisadas 180 amostras de leite provenientes de tanques de expansão encontrando concordância de 80% entre os testes. Nenhuma amostra positiva foi considerada falso positiva, portanto, em ambos os testes a especificidade foi considerada 100%, enquanto a sensibilidade na PCR foi de 76,7% e no cultivo foi de 68,9%. No presente estudo, obteve-se 35% (n=6) amostras falso negativas no cultivo microbiológico em meio Hayflick, quando comparado ao método PCR.

Apesar do cultivo microbiológico não ter sido o objetivo principal deste trabalho, a avaliação deste parâmetro nas mastites clínicas é de suma importância para atualização de dados nas propriedades e regiões estudadas. Foi encontrada a prevalência de 27,1% de *Streptococcus* não agalactiae (*S. uberis* e *S. dysgalactiae*) e 23,1% de patógenos Gram negativos (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia rubideae*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii* e *Serratia marscescens*), que são considerados patógenos ambientais causando, na maioria das vezes, mastite clínica aguda, concordando com Sumathi et al. (2008) que avaliaram também amostras de leite de animais com mastites clínicas.

Oliveira et al. (2015) ao analisarem mais de 4 mil amostras de leite de animais com mastite clínica no Brasil, encontraram prevalência semelhante a obtida no presente estudo, sendo 19% de mastites causadas por coliformes. No entanto, a prevalência encontrada no presente estudo de mastite causada por *Streptococcus* não agalactiae (*S.*

uberis e *S. dysgalactiae*) foi maior que a obtida por Oliveira et al. (2015), inferior a 10%.

Vários fatores contribuem para as diferenças da microbiota nas mastites subclínicas e clínicas, em vacas, particularmente no que se refere ao manejo higiênico sanitário e condições ambientais (RIBEIRO et al., 2016). Desta forma, a avaliação dos patógenos envolvidos nas mastites é um ponto relevante para análise de fatores de riscos na propriedade, em um programa de controle. A vigilância epidemiológica a partir do estudo de fatores de risco possibilita orientar a adequação do manejo visando aumento da produção leiteira, além de se melhorar a qualidade higiênica do leite produzido na propriedade (LANGONI et al., 2013).

A partir desse monitoramento rigoroso alguns países desenvolvidos conseguiram controlar a presença de mastites causadas por certos patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus dysgalactiae* (DODD, 1983; KEEFE, 2012) e erradicar em algumas propriedades *Streptococcus agalactiae* (KEEFE, 1997).

Deve-se enfatizar a importância do diagnóstico microbiológico nas mastites, com intuito de conhecer a microbiota envolvida na etiologia, que possibilita ações específicas no controle/profilaxia dos agentes contagiosos ou ambientais (DOMINGUES & LANGONI, 2001). No presente estudo, 9 (52,9%) amostras de leite seriam consideradas negativas caso não fosse realizada concomitante a detecção molecular de micoplasma.

Atualmente a pesquisa do agente infeccioso em patologia humana e veterinária deve ser pautada em técnicas que possibilitam e elucidam não somente o micro-organismo envolvido, mas também características inerentes ao patógeno, contribuindo para o estudo da epidemiologia molecular, para que de fato possam ser estabelecidas medidas de controle mais efetivas. Especificamente relacionado aos micoplasmas como patógeno nas mastites, novas pesquisas devem ser propostas incluindo-se a caracterização molecular dos isolados correlacionando os resultados com fatores de risco para as mastites contagiosas, com material de diferentes propriedades e de localizações variadas. Com esse perfil será possível obter mais informações sobre o seu papel na etiologia e patogenia das mastites bovinas.

7. CONCLUSÕES

Pode-se concluir pela dispersão de *Mycoplasma bovis* nos rebanhos leiteiros avaliados, apesar da prevalência ser menor quando se compara com a de outros países. Enfatiza-se a sua importância do patógeno na etiologia das mastites bem como de novos estudos, contemplando um número maior de rebanhos, de diferentes localidades do país, bem como a avaliação de amostras de tanques de expansão das propriedades, incluindo o cultivo e exame molecular por PCR, para elucidar a importância deste patógeno na etiologia das mastites no país.

Quanto aos demais micro-organismos isolados, tem-se o encontro de um microbiota aeróbica variada sendo os gêneros *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. os mais frequentes.

8. REFERÊNCIAS

- ASKAA, G.; ERNØ, H. Evaluation of *Mycoplasma agalactiaesubsp.bovis* to species rank *Mycoplasma bovis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 11, p. 432-435, 1999.
- 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, p.1163–1166, 2003.
- BOSISIO, D.F.; PEDRA, M.; PIGATTO, G.; SANTINI, G.; SANTINI, A. Análise de fatores produtivos e comerciais da cadeia láctea no Brasil. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008, Rio Branco. *Anais eletrônicos*. Rio Branco, AC, 2008. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228547655_Analise_de_fatores_produtivos_e_comerciais_da_cadeia_lactea_no_Brasil>. Acesso em: 14 de Fev de 2017.
- 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. *Vet. Rec.* v.160, p.253–258, 2007.
- BRAMLEY, J. Identifying mastitis problems and strategies for control. *Proceedings of the 31st National Mastitis Council*. Arlington: National Mastitis Council Inc., 1992. p. 5-14.
- BRANT M. C.; FIGUEIREDO J. B. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 46, p. 595-606, 1994.
- BUENO, V. F. F. B., NICOLAU, E. S., MESQUITA, A. J., RIBEIRO, A. R., SILVA, J. A. B., COSTA, E. O., COELHO, K. O., NEVES, R. B. S. Mastite bovina clínica subclínica, na região de Pirassununga, SP: Frequências e redução na produção. *Ciência Animal Brasileira*, v. 3, n. 2, p. 47-52, 2006.
- BUSHNELL, R. B. Mycoplasma mastitis. Symposium on mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice*, v. 6, n. 2, p. 301-12, 1984.
- BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasmas* pp. E *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 59, p. 1368-1375, 2007.
- BYRNE, W.; MARKEY, B.; MCCORMACK, R.; EGAN, J., BALL, H.; SACHSE, K. Persistence of *Mycoplasma bovis* infection in the mammary glands of lactating cows inoculated experimentally. *Vet. Rec.* v.156, p.767–771, 2005.

CAI, H. Y.; BELL-ROGERS, P.; PARKER, L.; PRESCOTT, J. F. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, n. 6, p. 537-545, 2005.

CANADIAN DAIRY INFORMATION CENTER. *Number of farms, dairy cows and heifers*. Ottawa: Dairy Section, Agriculture and Agri-Food Canada, 2016. Disponível em: <http://www.dairyinfo.gc.ca/index_e.php?s1=dff-fcil&s2=farm-ferme&s3=nb>. Acesso em: 12 Jan. 2017.

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. *Veterinary Microbiology*, v. 72, p. 241-250, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Leite e derivados*. Brasília: CONAB, 2016. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_04_17_33_34_leite_abril_2016.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2017

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

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; WHITE, C. R.; PARDO, R. B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 17, n. 5, p. 215-217, 1995.

COSTA, G. M. D.; SILVA, N. D.; ROSA, C. A.; FIGUEIREDO, H. C. P. D.; PÁDUA PEREIRA, U. D. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Ciência Rural*. v.38, p.7, 2008.

DAMASSA, Al 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.

DEAN, A. G.; SULLIVAN, K. M.; SOE, M. M. *OpenEpi*: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. Versão 2013. Disponível em: www.OpenEpi.com. Acesso em: 10 set. 2015.

DODD, F. H. Mastitis—progress on control. *Journal of dairy science*, v.66, n.8, p.1773-1780, 1983.

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. *Manejo sanitário Animal*. Rio de Janeiro: EPUB, 2001. 210 p.

DU PREEZ, J. H.; GIESECKE, W. H. Mastitis. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R. *Infectious diseases of livestock*. Oxford: Oxford University Press, 1994. v. 2, chap. 190, p. 1564-1595.

ELIAS, A. O.; CORTEZ, A.; BRANDÃO, P. E.; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. *Research in Veterinary Science*, v. 93, n. 1, p. 34-38, 2012.

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.

FONSECA, M. I. Influência do processo de ordenha manual na qualidade do leite cru produzido em propriedade rural familiar. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, n. 2, supl. 1, p. 393-394, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Rapid methods for detecting foodborne pathogens*. Silver Spring: FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2006.

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.; HANCOCK, D. D.; MICKELSON, A.; BRITTEN, A.; KAADEN, O. R. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma* sp. in milk. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, v. 50, n. 5, p. 235-240, 2003.

FOX, L. K.; KIRK, J. H.; BRITTEN, A. *Mycoplasma* Mastitis: A Review of Transmission and Control. *Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, v. 52, p. 153-160, 2005.

FRANCHESCHINI, V.; NOGUEIRA, M.; VICTORIA, C.; SILVA, R.; LANGONI, H. Research for *Mycoplasma* spp. in milk samples from mastitic cows. *Ars Veterinaria*. v..22, n.2, p.130-134, 2008.

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, 2012.

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

GIANNECHINI, R.; CONCHA, C.; RIVERO, R.; DELUCCI, I.; MORENO LOPEZ, J. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet. Scand.* v.43, p.221-230, 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. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.*, v. 19, p. 199-221, 2003.

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

GOURLAY, R. N.; THOMAS, L. H.; WYLD, S. G. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Veterinary Record*, v. 124, p. 420-422, 1989.

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.

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

HALE, H. H.; HELMBOLDT, C. F.; PLASTRIDGE, W. N.; STULA, E. F. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Veterinarian*, v. 52, p. 582-591, 1962.

HOULIHAN, M. G.; VEENSTRA, B.; CHRISTIAN, M. K.; NICHOLAS, R.; AYLING, R. Mastitis and arthritis in two dairy herds caused by *Mycoplasma bovis*. *The Veterinary Record*, v. 160, n. 4, p. 126, 2007.

JACKSON, C. R.; LOMBARD, J. E.; DARGATZ, D. A.; FEDORKA-CRAY, P. J. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. *Letters in applied microbiology*. v.52, n.1, p.41-48, 2011.

JANK, M. S.; FARINHA, E. M. M. Q.; GALAN, V. B. *O agribusiness do leite no Brasil*. São Paulo: Milkbuzz, 1999. p. 108.

JÁNOSI, S.; RATZ, F.; SZIGETI, G.; KULCSAR, M.; KERENYI, J.; LAUKO, T.; KATONA, F.; HUSZENICZA, G. Pathophysiology: Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *Veterinary Quarterly*. v.23, n.2, p.58-61, 2001.

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. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 3561-3573, 2003.

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. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 7, p. 3411-3419, 2011.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *The Canadian veterinary journal*, v.38, n.7, p.429, 1997.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*, v.28, n.2, p. 203-216, 2012.

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

KOBISCH, M.; FRIIS, N.F. Swine mycoplasmoses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, v.15, n.4, p.1569-1605, 1996.

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. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 620-626, 2013.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; SILVA, A. V. Aspectos etiológicos na mastite bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 20, p. 204-210, 1998.

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

MAEDA, T.; SHIBAHARA, T.; KIMURA, K.; WADA, Y.; SATO, K.; IMADA, Y.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. *Mycoplasma bovis*- associated suppurative otitis media and Pneumonia in Bull Calves. *Journal Of Comparative Pathology*, v. 129, p. 100-110, 2003.

MANZI, M. P. *Prevalência de Mycoplasma bovis em rebanhos de vacas leiteiras do interior do estado de São Paulo*. 2014. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

METTIFOGO E.; NASCIMENTO, E. R.; MÜLLER, E. E.; NASCIMENTO, M. G. F.; FREITAS, J. C. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 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: QualityMilk, 2013. Disponível em: <<http://www.laboratti.com.br/artigos-sobre-patologia-veterinaria/mastite-por-mycoplasma-bovis-surtos-em-minas-gerais-levam-ao-descarte-de-animais-produtivos>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

MIRANDA-MORALES, R. E.; ROJAS-TREJO, V.; SEGURA-CANDELAS, R.; CARRILLO-CASAS, E. M.; SANCHEZ-GONZALEZ, M. G.; CASTOR, R. S. Prevalence of pathogens associated with bovine mastitis in bulk tank milk in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1149, p. 300-302, 2008.

MUNOZ, M. A.; AHLSTRÖM, C.; RAUCH, B. J.; ZADOKS, R. N. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.89, p.3425-3430, . 2006.

MURRAY, P. R.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; BARON, E. J.; LANDRY, M. L. *Manual of clinical microbiology*. 9. ed. Washington: ASM Press, 2007. 1773 p.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI,M.(Eds.).Doenças das aves.Campinas:FACTA, 2000. p.217-224.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Madison, WI.

NICHOLAS R. A. J. 2002. *Mycoplasma bovis*. In: Compendium of Animal Health and Production 2002a. Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, UK.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2003.

OLDE RIEKERINK, R. G.; BARKEMA, H. W.; KELTON, D. F.; SCHOLL, D. T. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J. Dairy Sci.* v.91, p.1366–1377, 2008.

OLIVEIRA, C. S. F.; HOGEVEEN, H.; BOTELHO, A. M.; MAIA, P. V.; COELHO, S. G.; HADDAD, J. P. A. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 121, n. 3, p. 297-305, 2015.

PARANÁ. SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. DERAL - Departamento de Economia Rural. *Análise da conjuntura agropecuária*. Disponível em:<
http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/bovinocultura_leite_14_15.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.

PAULIN-CURLEE, G. G.; SINGER, R. S.; SREEVATSAN, S.; ISAACSON, R.; RENEAU, J.; FOSTER, D.; BEY, R. Genetic diversity of mastitis-associated *Klebsiella pneumoniae* in dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.90, p.3681-3689, 2007.

PFUTZNER, H. Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt fur Bakteriologie Supplement*, v. 20, p. 394-399, 1990.

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. *Mastitis counter attack*: a strategy to combat mastitis. Naperville: Babson Bros, 1991. p. 150.

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

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 84, n. 5, p. 1140-1148, 2001.

PRETTO, L. G.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E.; BUZIHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n. 4, p. 143-145, 2001.

PUNYAPORNWITHAYA, V.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; ALLDREDGE, J. R. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. *Preventive Veterinary Medicine*. v.93, n.1, p.66-70, 2010.

PUNYAPORNWITHAYA, V.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; WENZ, J. R.; ALLDREDGE, J. R. Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis* mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study. *Preventive Veterinary Medicine*. v.98, n.1, p.74-78, 2011.

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

RADAELLI, E.; LUINI, M.; LORIA, G. R.; NICHOLAS, R. A. J.; SCANZIANI, E. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Research in Veterinary Science*, v. 85, p. 282-290, 2008.

RAZIN S.; YOGEV D.; NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. v.62, p.1094–156, 1998.

RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M. F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JUNIOR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. C.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação Entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

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.

RIFATBEGOVIC, M.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, J. B.; PASIC, S. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina. *Veterinary Record*, v. 160, p. 484-485, 2007.

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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 7, p. 2584-2589, 2001.

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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 2584-2589, 2001.

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; 1994. p. 3–11.

ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. *The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection*. In: STIPKOVITS, L.; ROSENGARTEN, R.; FREY, J. (Ed.). *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. Brussels: European Commission, 1999. v. 3, p.14-17.

RUHNKE, H. L. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Ed.). *Mycoplasmosis in animals*. Ames: Iowa State University Press, 1994. p. 56-61.

SHOCKEN-ITURRINO R. P. A.; NADER FILHO F. A.; AVILA G. P. C. Sensibilidade dos *Staphylococcus* coagulase positiva, isolados em casos de mastite subclínica bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. *ARS Veterinária*, v. 12, n. 1, p. 57-63, 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 2. ed. São Paulo: LivrariaVarela, 2001. p. 229.

SUMATHI, B. R.; VEEREGOWDA, B. M.; AMITHA, R. Gomes. Prevalence and antibiogram profile of bacterial isolates from clinical bovine mastitis. *Veterinary World*, v.1, n.8, p.237-238, 2008.

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.

THOMAS, C. B. Bovine mycoplasmas: a practitioners orientation to host and agent interactions. In: WISCONSIN *VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, ANNUAL CONFERENCE VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION*, 84, 1998, Madson. *Proceedings...* Madson: *Veterinary Medical Association*, 1998. p. 255.

THOMAS, C. B.; WILLEBERG, P.; JASPER, D. E. Case-control study of bovine mycoplasmal mastitis in California. *American Journal of Veterinary Research*, v. 42, p. 511, 1981.

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

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

TRIGO-TAVERA, F. J. Prevalence of pathogens associated with bovis mastitis Mastitis in Bulk Tank Milk in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1149, n. 1, p. 300-302, 2009.

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.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. *Charts and maps*. Washington: USDA, 2017. Disponível: <https://www.nass.usda.gov/Charts_and_Maps/Milk_Production_and_Milk_Cows/>. Acesso em: 20 jan. 2017.

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.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 16, n.1, p. 41-66, 1988.

WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames: Iowa StateUniversity, 1994. 150 p.

WILSON, D. J.; GOODELL, G.; JUSTICE-ALLEN, A.; SMITH, S. T. Herd-level prevalence of *Mycoplasma* spp mastitis and characteristics of infected dairy herds in Utah as determined by a statewide survey. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 235, n. 6, p. 749-754, 2009.

WILSON, D. J.; SKIRPSTUNAS, R. T.; TRUJILLO, J. D.; CAVENDER, K. B.; 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.

ZOCCAL, R. O leite no Brasil. In: *ANUÁRIO brasileiro do leite*. Passo Fundo: O Nacional, 2008.

ZOCCAL, R.; DUSI, G. A. *Modelo ideal para produção de leite no Brasil*. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura, 2013. p. 34-37. Disponível em: <http://www.sna.agr.br/uploads/AnimalBusiness_09_34.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2017.

ZOCCAL, R.; GOMES, A. T. *Zoneamento da produção de leite no Brasil*. Brasília: SOBER, 2005.