

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
DE *Mycoplasma* spp. A PARTIR DO LEITE DE MASTITE CLÍNICA
BOVINA**

ANELISE SALINA

Botucatu – SP
Novembro 2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
DE *Mycoplasma* spp. A PARTIR DO LEITE DE MASTITE CLÍNICA
BOVINA**

ANELISE SALINA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

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: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Salina, Anelise.

Avaliação microbiológica e molecular de isolados de *Mycoplasma* spp. a partir do leite de mastite clínica bovina / Anelise Salina. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502000

1. Bovino - Doenças. 2. Micoplasmose em animais. 3. Mastite. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Mycoplasmatales. 6. Leite - Contaminação.

Palavras-chave: Leite; Mastite Bovina; Micoplasmose; Mollicutes; PCR.

*“Independente do desafio
aja no limite do esforço e
seja competente. O resto é
resultado”.*
(Thimer)

Nome do Autor: Anelise Salina

Título: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Mycoplasma* spp. A PARTIR DO LEITE DE MASTITE CLÍNICA BOVINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Dr. Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu

Dr. Felipe de Freitas Guimarães

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu

Professora Dr^a Simone Baldini Lucheis

Membro

Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bauru - SP

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios - APTA - Sede Bauru

Professora Dr^a. Renata Bonini Pardo

Membro

Faculdade de Tecnologia – FATEC

Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza

Dr^a. Carla Gasparotto Chande Vasconcelos

Membro

VidaVet Laboratório Veterinário – Botucatu/SP

Data da Defesa: 28 de Novembro de 2018.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Marisa, que não mede esforços para me ajudar em tudo que necessito, sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e dando força e amor para seguir até aqui. Sem ela nada disso seria alcançado.

Ao meu namorado Fernando, pelo companheirismo, paciência e mesmo longe fisicamente, sempre comigo em meus pensamentos. Já se passaram sete anos desde o início da minha jornada em Botucatu.

Aos meus familiares, Sonia, Anna Carla, Augusto, José Luis e Gustavo.

À minha avó Angelina (em memória), que sempre se orgulhou de mim, celebrou comigo todas as conquistas e infelizmente se foi antes de compartilhar mais esta vitória.

E claro, não poderiam faltar meus filhos de quatro patas: Chicó, Dora e Lili.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força nos momentos difíceis e alegria nas conquistas alcançadas.

Ao meu orientador Prof. Helio Langoni, pelo acolhimento e confiança no meu trabalho e pela orientação nesses últimos sete anos desde o início da jornada acadêmica.

Ao Prof. Dr. Jorge Timenetski, docente da USP, campus São Paulo, pela disponibilidade em utilizar seu laboratório. Pela concessão da cepa *Mycoplasma bovis* Donetta para uso como controle positivo.

Ao Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, docente colaborador da USP, campus São Paulo, pela ajuda quanto às ideias relacionadas ao projeto.

À equipe do Laboratório de Micoplasmas da USP, Maysa, Isadora, Aline, Camila e Natália, pela ajuda durante o período de parte das análises.

Aos colegas do NUPEMAS, pelo convívio diário no laboratório.

À médica veterinária Cristiane Azevedo e equipe, pelo encaminhamento das amostras de leite.

Ao laboratório VidaVet – Botucatu, em especial à Dra. Carla Vasconcelos, pela concessão da cepa *Mycoplasma arginini* para uso como controle positivo.

À Dra. Lais Paiz, amiga que ajudou com as análises filogenéticas.

À minha família, em especial, a minha mãe, por me proporcionar esta oportunidade de estar aqui em Botucatu e poder cursar a pós-graduação, pelo seu carinho, amor e confiança.

Ao meu namorado Fernando, que sempre esteve ao meu lado, me deu apoio e incentivo para continuar nessa caminhada.

A Capes, pela concessão de bolsa para a realização deste trabalho.

A todos que me ajudaram a vencer mais uma batalha, em especial àqueles que duvidaram e essa dúvida só fez aumentar a minha persistência e força de vontade.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Colônias de *Mycoplasma bovis* em meio de cultura sólido Hayflick. Isolamento após três dias de incubação em estufa de CO₂ a 37°C, evidenciando a característica de “ovo frito”. NUPEMAS, FMVZ, 2018.....6
- Figura 2: Gráfico de amplificação da curva padrão à PCR em tempo real.....30
- Figura 3: A: Cultivo microbiológico evidenciando mais de um padrão de colônia. B: Cultivo microbiológico após sucessivos reisolamentos, evidenciando padrão único de colônia. C: Controle positivo *Mycoplasma bovis* Donetta. NUPEMAS, FMVZ, 2018.....32
- Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% demonstrando os produtos amplificados de *Mycoplasma bovis* e Mollicutes, obtidos de isolados em caldo PPLO. Identificação pelo método de PCR convencional, com produto de 360 pares de base (pb) e 270 pb, para *Mycoplasma bovis* e Mollicutes, respectivamente. Controle positivo: *Mycoplasma bovis* Donetta (ATCC 25523); Controle Negativo: Água ultra pura.....33
- Figura 5: Análise filogenética de 11 isolados de *Mycoplasma bovis* obtidos de casos de mastite clínica bovina, identificados na imagem com a palavra “sample” seguida do número de identificação de cada amostra. As sequências de diferentes espécies de micoplasmas inclusas na análise estão identificadas com o número de acesso na base de dados do GenBank. Árvore condensada obtida a partir de 1000 replicatas de *Bootstrap* pelo método Maximum Likelihood. Ramificações correspondentes a partições reproduzidas em menos de 70% de réplicas de *Bootstrap* são colapsadas. A sequência de *Acholeplasma laidlawii* foi utilizada como *Outgroup*.....34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Principais Mollicutes patogênicos em animais (FREY, 2002 adaptado).....	11
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados gerais das análises moleculares para <i>Mycoplasma bovis</i> e cultivo microbiológico de amostras de leite de casos de mastite clínica bovina. Botucatu, 2018.....	29
---	----

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Características gerais do gênero <i>Mycoplasma</i>	5
2.3 Micoplasmose nos animais	9
2.4 Mastite bovina causada por <i>Mycoplasma</i> spp.....	12
2.6 Prevenção e controle.....	16
2.7 Tratamento	17
2.8 Justificativa.....	19
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Geral.....	20
3.2 Específicos	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Amostras	21
4.2 Análises moleculares.....	21
4.2.1 Extração do DNA	21
4.2.2 PCR para detecção de <i>Mollicutes</i> e <i>Mycoplasma bovis</i>	22
4.2.3 Detecção de <i>Mycoplasma bovis</i> por PCR em tempo real.....	23
4.3 Isolamento em meio Hayflick e SP4 suplementado.....	24
4.6 Determinação do número de isolados do agente e análise estatística	27
5 RESULTADOS.....	28
5.1 Resultados das análises moleculares	28
6 DISCUSSÃO.....	35
6.1 Detecção molecular.....	35

6.2	Cultivo microbiológico.....	39
7	CONCLUSÕES.....	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
	TRABALHO CIENTÍFICO.....	56

Anelise Salina. **Avaliação microbiológica e molecular de isolados de *Mycoplasma* spp. a partir do leite de mastite clínica bovina.** Botucatu, 2018. 64p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

RESUMO

O gênero *Mycoplasma* inclui mais de 200 espécies responsáveis por causar doenças nos animais. Apresenta células de tamanho reduzido e em formatos variáveis. Ocasionalmente causa mastite em bovinos, podendo também, estar relacionado a outras manifestações como artrite e pneumonia em bezerras e novilhas. Neste estudo, objetivou-se o isolamento de espécies de micoplasmas a partir de amostras de leite de mastite clínica bovina, bem como, a detecção de *Mycoplasma (M.) bovis* pelas técnicas moleculares de PCR convencional e PCR em tempo real. Um total de 1166 amostras de leite de casos de mastite clínica, provenientes de nove propriedades leiteiras da região da bacia leiteira ABCW – Paraná e de uma propriedade situada na região de São Pedro – São Paulo foram avaliadas para a presença do DNA de Mollicutes. Desse total, em 100 amostras de leite que foram positivas à PCR para a classe Mollicutes, realizou-se a PCR para detecção de *M. bovis* obtendo-se positividade de 13% (13/100). Na análise pela PCR em tempo real obteve-se 11% (11/100) de amostras positivas para *M. bovis*. No cultivo microbiológico, obteve-se 6% (6/100) de crescimento ao se utilizar o meio Hayflick e, 11% (11/100) de crescimento ao se utilizar o meio SP4 (incluindo as positivas ao primeiro). A partir desses isolados em caldo PPLO, nove deles foram positivos à PCR convencional para *M. bovis* e dois, negativos. Na análise filogenética dos isolados, a partir dos resultados do sequenciamento, obteve-se 100% de *M. bovis* para todos os isolados. Frente aos resultados obtidos, ressalta-se a importância de estudos mais aprofundados para a elucidação de outras espécies de micoplasmas envolvidas na mastite bovina, e reforça a participação de *M. bovis* na sua etiologia.

Palavras-chave: Micoplasmose, PCR, Mastite Bovina, Mollicutes, Leite.

ABSTRACT

The *Mycoplasma* genus includes more than 200 species responsible for causing diseases in animals. It presents cells of reduced size and in variable shapes. It may cause mastitis in cattle, and may also be related to other manifestations such as arthritis and pneumonia in calves and heifers. The objective of this study was to isolate mycoplasma species from bovine clinical mastitis milk samples, as well as the detection by molecular techniques of conventional PCR and real-time PCR of *M. bovis*. A total of 1166 milk samples from clinical mastitis cases from nine dairy farms in the ABCW - Paraná dairy region and from a property located in the São Pedro region - São Paulo were evaluated for the presence of Mollicutes DNA. From this total, 100 milk samples that were PCR positive for the Mollicutes class, the PCR was performed to detect the *M. bovis*, obtaining 13% positivity (13/100). Real-time PCR analysis yielded 11% (11/100) of positive samples for *M. bovis*. In the microbiological culture, 6% (6/100) of growth was obtained when using the Hayflick medium and 11% (11/100) growth when using SP4 medium (including positive ones in the first one). From these isolates in PPLO broth, nine of them were positive to conventional PCR for *M. bovis* and two, negative. In the phylogenetic analysis of the isolates, from the results of the sequencing, 100% of *M. bovis* was obtained for all the isolates. In view of the results obtained, the importance of further studies for the elucidation of other species of mycoplasmas involved in bovine mastitis is emphasized, and reinforces the participation of *M. bovis* in its etiology.

Key words: Mycoplasmosis, PCR, Bovine Mastitis, Mollicutes, Milk.

1 INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença de importância econômica nos rebanhos leiteiros devido à sua alta prevalência. Sua presença no rebanho causa queda na produção, menor rendimento de produtos lácteos e perda da qualidade do leite, custos com medicamentos para tratamento e também com honorários profissionais. Em alguns casos, a lesão do úbere pode levar à sua perda, em decorrência da grave sintomatologia ou ainda, ocasionar a morte prematura do animal após quadros de septicemias dependendo do patógeno envolvido (LANGONI, 2013).

Diversas espécies de micro-organismos estão envolvidas na etiologia das mastites, classificados em contagiosos ou ambientais. De origem contagiosa, a mastite bovina causada por bactérias pertencentes à classe Mollicutes são de grande preocupação nas propriedades leiteiras.

Entre as espécies isoladas está *M. bovis*, responsável por ocasionar problemas respiratórios, surtos de mastite clínica e acentuada queda na produção de leite, principalmente em grandes rebanhos (AEBI et al., 2012; POTHMANN et al., 2015). Por outro lado, em rebanhos com menor número de animais, as manifestações decorrentes da presença de *M. bovis*, ocorrem principalmente na forma de artrite e pneumonia em bezerras e novilhas (PFÜTZNER e SACHSE, 1996).

Um dos entraves da eliminação da micoplasmose mamária nos rebanhos é o fato da detecção desse patógeno não estar incluída na rotina laboratorial de diagnóstico de mastite. Quando detectada sua presença no leite, aconselha-se o descarte do animal afetado, ou a sua manutenção em currais isolados, a fim de se evitar a disseminação para outros animais do rebanho, uma vez que a mastite por micoplasmas pode ser difundida rapidamente em até 40% do rebanho durante um surto (NICHOLAS et al., 2016).

Para se evitar surtos de micoplasmose mamária em rebanhos leiteiros, recomenda-se a inclusão do diagnóstico microbiológico ou molecular para detecção precoce do patógeno em amostras de leite, ou amostras clínicas compatíveis com micoplasmose. Técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas na detecção de *M. bovis* em amostras de leite (BAIRD et al., 1999; AEBI et al., 2012; HIGUCHI et al., 2013).

Sugere-se o monitoramento da presença de micoplasmas utilizando-se como triagem a detecção destes patógenos em amostras de leite de tanques de expansão das propriedades, especialmente as de alta produção, já que podem causar mastite subclínica (NICHOLAS et al., 2016).

Considerando-se a importância das mastites, seu impacto negativo na cadeia produtiva do leite e a alta prevalência de mastites por *Mycoplasma* spp. relatada na literatura internacional, propusemos o presente estudo a fim de detectar as espécies envolvidas em casos de mastite clínica em propriedades leiteiras de alta produção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do gênero *Mycoplasma*

Pertencentes ao filo Tenericutes, classe Mollicutes, os membros procariontes dessa classe possuem como principal característica a flexibilidade, resultante da ausência de parede celular. Devido a essa flexibilidade de membrana, a maioria dos Mollicutes é filtrável por membranas de 450 nm, ou ainda, algumas células menores, podem atravessar membranas de 220 nm ou até 100 nm. A ausência de parede celular confere a essa classe resistência à beta-lactâmicos, como a penicilina e seus derivados, bem como sensibilidade e lise por choques osmóticos, detergentes e alcoóis (BROWN et al., 2011).

Não se coram ao Gram, e apresentam formato que variam de estruturas esféricas ou semelhantes a balão a filamentos ramificados ou helicoidais à microscopia eletrônica, dependendo da pressão osmótica, qualidade nutricional do meio de cultura e também da fase de crescimento (RAZIN et al., 1998).

A dificuldade ao se estudar os micro-organismos da classe Mollicutes é atribuída às suas necessidades nutricionais e as peculiaridades relacionadas a cada espécie, essas características levaram uma atenção especial quanto à sua filogenia. Duas hipóteses sugerem a evolução de micoplasmas, sendo que a primeira supõe que os micoplasmas descendem de uma classe primitiva de micro-organismos; e a segunda, que provém de uma degeneração de bactérias gram positivas, possivelmente clostrídios (FADIEL et al., 2007).

Em meio de cultura sólido, as colônias apresentam tamanho muito reduzido, em média menos de 1 mm de diâmetro, e possuem como característica o crescimento que adentra a superfície do ágar com aparência de “ovo-frito” (PRETTO et al., 2001), como representado na Figura 1.

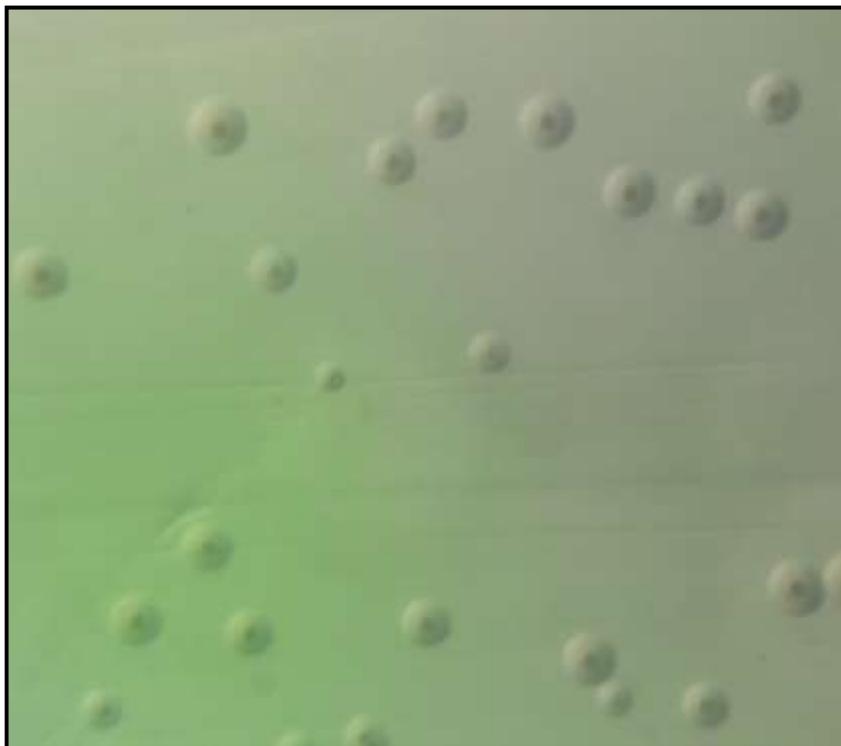


Figura 1: Colônias de *Mycoplasma bovis* em meio de cultura sólido Hayflick. Isolamento após três dias de incubação em estufa de CO₂ a 37°C, evidenciando a característica de “ovo frito”. NUPEMAS, FMVZ, 2018.

2.2 Micoplasmose: Visão geral sobre ocorrência e perdas

Desde os primeiros relatos do isolamento de Mollicutes na literatura (NOCARD e ROUX, 1898; HALE et al., 1962) essa classe tem sido amplamente pesquisada. A literatura relata casos de ocorrências de surtos; pesquisas e desenvolvimento de vacinas; desenvolvimento e padronização de técnicas moleculares; ocorrência de novas espécies causadoras de infecções; entre outras (FREY et al., 1999; NICHOLAS et al., 2002; ANGEN et al., 2009; AEBI et al., 2012; MANZI et al., 2018).

Na medicina veterinária, a presença de micoplasmas causa doença nos animais, incluindo a mastite, e resulta em perdas econômicas decorrentes de queda de produção e custos com tratamentos dos animais.

Os Mollicutes possuem como característica a relação da espécie com o tecido do hospedeiro, mas pode em alguns casos ocorrer em locais diferentes do seu *habitat* normal. Embora algumas espécies sejam saprófitas ou

comensais, a maioria são consideradas patogênicas para os animais (RAZIN et al., 1998). As manifestações clínicas ocorrem com quadros de mastite, artrite ou doença respiratória em bovinos (NICHOLAS e AYLING, 2003); agalaxia contagiosa, em pequenos ruminantes (MADANAT et al., 2001); sintomatologia respiratória nas aves (PAPAZISI et al., 2003), entre outras manifestações e espécies de animais que podem albergar o agente.

A ocorrência de surtos relacionados à presença de espécies de micoplasmas é de grande preocupação na medicina veterinária. A partir da introdução de *M. bovis* em um rebanho, este micro-organismo pode rapidamente se disseminar entre os animais e ocasionar surto de mastite em vacas, e doença respiratória em bezerros (POTHMANN et al., 2015).

Pothmann et al. (2015) descreveram um surto em uma propriedade leiteira da Áustria envolvendo 19 animais. A introdução de *M. bovis* no rebanho estudado desencadeou rapidamente um surto com animais apresentando sintomatologia respiratória severa, mastite clínica e queda drástica na produção de leite. Devido à grave sintomatologia apresentada pelos animais, cinco morreram ou foram eutanasiados em duas semanas. As análises moleculares revelaram a ocorrência de única cepa de *M. bovis* responsável pelo surto. Grandes perdas econômicas foram relatadas, decorrentes da queda de produção, custos com medicamentos e descarte de animais.

Em 1999 as perdas econômicas resultantes de *M. bovis* nos animais, relatadas no Reino Unido, ultrapassam 54 milhões de libras, com acometimento de aproximadamente 1,9 milhões de animais naquele ano. Na Europa as perdas foram de 576 milhões de euros no ano de 2000. Já nos EUA, a ocorrência de mastite bovina por este patógeno é maior que a ocorrência de doença respiratória, e ultrapassou em anos anteriores um total de 108 milhões de dólares anuais de perdas econômicas (NICHOLAS e AYLING, 2003).

Atualmente, na Nova Zelândia, o governo estima que para a erradicação ou para o controle de *M. bovis* no país, deverão ser gastos mais de 500 milhões de dólares em um período de 10 anos. Desde a sua detecção, em 2017, estima-se que já foram gastos 100 milhões de dólares com indenizações, análises do leite para determinação da disseminação do patógeno no país e atualização de sistemas para rastreamento dos animais acometidos (USDA, 2018), denominado *National Animal Identification and Tracing* (NAIT).

Esforços relacionados à detecção e erradicação de *M. bovis* em rebanhos têm como objetivo principal evitar a disseminação entre os animais e diminuir as perdas resultantes da sua presença (PARKER et al., 2018).

Na medicina humana *M. pneumoniae* é frequente em infecções no trato respiratório, principalmente em crianças. Surtos de pneumonia por este agente são relatados na literatura a cada 3-7 anos, com a hipótese de variações de subtipos de *M. pneumoniae* ocorrendo na população humana. Na maioria dos casos a sintomatologia é leve, com traqueobronquite, dores de cabeça e tosse; em casos severos, o envolvimento extrapulmonar pode levar à morte pelo acometimento neurológico (WINCHEL et al., 2008).

Outra manifestação reconhecida em humanos é a infecção do trato urinário. *Ureaplasma urealyticum*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans* são patógenos reconhecidos por causarem doença em humanos (CORDOVA e CUNHA, 2002).

Culturas celulares estão susceptíveis à contaminação por micro-organismos da classe Mollicutes. São relatadas mais de 20 espécies isoladas de cultivos contaminados, entre eles: *M. orale*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis* ou *Acholeplasma laidlawii*, que representam 90 a 95% das espécies identificadas, podendo ocorrer variação nas taxas de isolamento de acordo os estudos. A presença desses micro-organismos em cultivos celulares acarreta efeitos citopáticos graves (DREXLER e UPHOFF, 2002) e dificulta o diagnóstico a partir do isolamento de determinados patógenos, principalmente vírus.

Diferente da contaminação por fungos ou outras bactérias, a presença de micoplasmas em culturas celulares não é visível a olho nu, podendo permanecer por longo período sem danos celulares perceptíveis. Nikfarjam e Farzaneh (2012) citam como principais fontes de contaminação celular: o corpo técnico dos laboratórios, que disseminam espécies de origem humana; o soro fetal bovino, responsável pela contaminação de origem bovina; solução contendo tripsina é uma das fontes de origem de suínos. Os autores sugerem o uso de antimicrobianos apenas para cultivos celulares muito valiosos, e recomendam o descarte da maioria de células contaminadas com micoplasmas.

2.3 Micoplasmose nos animais

Aproximadamente 200 espécies pertencentes à classe Mollicutes, principalmente espécies de micoplasmas, são reconhecidas como patógenos de importância em medicina veterinária. As espécies de micoplasmas que causam doenças em animais de produção são as mais importantes considerando as perdas econômicas que acarretam (FREY, 2002).

Várias espécies são descritas em ruminantes, ocasionando diferentes quadros de micoplasmose (JUNQUEIRA e LANGONI, 2016). A pleuropneumonia contagiosa bovina é uma doença severa causada por *M. mycoides* subsp. *mycoides* e ocorre com frequência em países da África. Em decorrência das grandes perdas econômicas com queda na produção, tratamento e morte dos animais, estudos buscam elucidar fatores de virulência associados ao agente (DI TEODORO et al., 2018). O principal mecanismo causador de doença nos animais é a capacidade de adesão ao tecido do hospedeiro, por lipoproteínas de superfície, como a LppA, por exemplo. A presença da proteína de membrana GlpO, resulta na produção de peróxido de hidrogênio, um composto altamente tóxico para as células do hospedeiro, desencadeando a morte celular por citotoxicidade (PILO et al., 2007).

O desenvolvimento de vacinas é uma ferramenta para o controle e erradicação da pleuropneumonia contagiosa (MWIRIGI et al., 2016). Em algumas regiões do mundo, como EUA e alguns países da Europa, a doença já foi erradicada desde o século 19. Na China, não há relatos de casos desde 1989 sendo considerada livre da doença em 2008 por meio da vacinação (XIN et al., 2012).

M. bovis é um importante patógeno na etiologia das mastites, pneumonia e artrite em bezerros. Seu principal fator de virulência está associado à sua capacidade de invadir o sistema imunológico do hospedeiro por um sistema de variação de antígeno de superfície (*vsp*). Essas proteínas de superfície de membrana proporcionam a essa espécie a capacidade de causar doenças crônicas a partir da falha do sistema imunológico em reconhecer esses antígenos, bem como a adaptação em diferentes ambientes no hospedeiro (BEHRENS et al., 1994).

M. dispar está relacionado com casos de broncopneumonia em bezerros (FREY, 2002), assim como outras espécies, como, por exemplo, *M. bovirhinis* (ANGEN et al., 2009). Em bovinos, *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. bovis*, *M. bovigentialium*, *M. leachii*, *M. bovirhinis*, *M. dispar*, *M. bovoculi* são espécies consideradas importantes que ocasionam quadros clínicos de pleuropneumonia, pneumonia, mastites e conjuntivite.

M. gallisepticum é um importante patógeno na avicultura, responsável por doenças respiratórias crônicas com grandes perdas econômicas. O sucesso na colonização do epitélio respiratório pelo micro-organismo se dá principalmente, pela presença de antígenos de variação de superfície responsáveis pela invasão do sistema imune do hospedeiro (PAPAZISI et al., 2003).

Na suinocultura, a pneumonia enzoótica dos suínos é uma grande preocupação devido à sua alta prevalência e perdas econômicas. Causada por *M. hyopneumoniae*, sua presença resulta em redução no crescimento promovendo susceptibilidade a outras doenças bacterianas e virais, como o circovírus suíno (CHAE, 2016).

No Quadro 1, estão relacionadas algumas das principais espécies de Mollicutes causadoras de doenças nos animais.

Quadro 1: Principais Mollicutes patogênicos em animais (FREY, 2002 adaptado).

ESPÉCIE ANIMAL / Espécie Mollicutes	DOENÇA
BOVINOS	
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	Pleuropneumonia contagiosa bovina
<i>Mycoplasma</i> spp. bovino grupo 7	Pneumonia e artrite
<i>M. bovis</i>	Mastite, pneumonia e poliartrite (bezerros), metrite, aborto, esterilidade
<i>M. dispar</i>	Pneumonia (bezerros)
<i>M. californicum</i>	Mastite
<i>M. canadense</i>	Mastite
<i>M. bovigenitalium</i>	Mastite e doença genital
<i>M. bovocculi</i>	Conjuntivite
<i>Ureaplasma diversum</i>	Metrite, esterilidade, aborto
<i>Eperythrozoon wengonii</i>	Anemia
CAPRINOS E OVINOS	
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	Pleuropneumonia contagiosa caprina
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	Mastite, artrite
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	Pneumonia, mastite, artrite, septicemia (caprino)
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	Pneumonia, mastite, artrite, septicemia (caprino)
<i>M. agalactiae</i>	Agalaxia infecciosa
<i>M. ovipneumoniae</i>	Pneumonia (cordeiro)
<i>M. conjunctivae</i>	Ceratoconjuntivite contagiosa (ovino)
AVES DOMÉSTICAS	
<i>M. gallisepticum</i>	Doença respiratória crônica (galinha), sinusite, aerossaculite infecciosa (peru)
<i>M. synoviae</i>	Aerossaculite, artrite, tenossinovite
<i>M. meleagridis</i>	Aerossaculite, sinusite, artrite (peru)
<i>M. anseris</i>	Infecção do trato respiratório (ganso)
<i>Acholeplasma axanthum</i>	Aerossaculite (ganso)
SUÍNOS	
<i>M. hyopneumoniae</i>	Pneumonia enzoótica
<i>M. hyohinis</i>	Pneumonia, artrite
<i>M. hyosynoviae</i>	Artrite
<i>Eperythrozoon suis</i>	Anemia
EQUINOS	
<i>M. felis</i>	Pleurite
<i>M. equirinis</i>	
<i>M. equipharyngis</i>	
CÃES E GATOS	
<i>M. cynos</i>	Pneumonia
<i>M. felis</i>	Conjuntivite, pneumonia (gato)
<i>Haemobartonella canis</i>	Anemia (cão)
<i>Haemobartonella felis</i>	Anemia (gato)
PEQUENOS ROEDORES	
<i>M. arthritidis</i>	Artrite (rato)
<i>M. pulmonis</i>	Infecções no trato respiratório e genital (ratazana e rato)

2.4 Mastite bovina causada por *Mycoplasma* spp.

As mastites causadas por espécies de micoplasmas são uma preocupação na indústria leiteira. Vacas com mastite clínica podem apresentar febre, edema e endurecimento do úbere com alterações no leite, como a presença de sedimento ou aspecto aquoso (HIGUCHI et al., 2013) com elevadas perdas econômicas.

De acordo com Nicholas et al. (2016), as características das mastites por micoplasmas diferem de outros patógenos, como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. pelos seguintes fatores: são altamente contagiosas; afetam mais de um quarto mamário, o que resulta em significativa queda de produção; são refratárias à tratamentos com antimicrobianos; caracterizam-se por uma mastite purulenta, sem odor, com secreções descoloridas e, em alguns casos, as vacas podem permanecer sem alterações clínicas evidentes, mesmo em casos severos.

Mais de 25 espécies pertencentes à classe Mollicutes causam mastite e outras manifestações clínicas em novilhas e vacas. São mais frequentes em rebanhos leiteiros: *M. californicum*, *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovirhinalium*, *M. canadense*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* (HIGUCHI et al., 2013) e *M. bovis* (NICHOLAS e AYLING, 2003). A presença dessas espécies pode variar de acordo com a região geográfica dos diferentes estudos.

M. bovis continua sendo a espécie mais frequentemente isolada nos rebanhos leiteiros (AEBI et al., 2012; NICHOLAS et al., 2016; AL-FARHA et al., 2017). Entretanto, outras espécies também são isoladas. Em estudo realizado em oito províncias da Argentina, em amostras de leite oriundas de mastite bovina e também de tanque de expansão, foram encontradas *M. bovirhinis*, *M. alkalescens* e *M. californicum* (SOSA et al., 2017).

O primeiro relato de surto de mastite por *M. agalactiae* subsp. *bovis* foi descrito por Hale et al. (1962) em uma propriedade leiteira nos EUA. No Brasil, o primeiro relato da doença em rebanho leiteiro foi de Mettifogo et al. (1996), na região de Londrina, Paraná. Inúmeros relatos têm sido feitos a respeito da ocorrência da presença ou surtos de micoplasmose mamária ao redor do mundo, porém no Brasil, poucos estudos foram realizados a fim de se elucidar a ocorrência da micoplasmose mamária. Estudos no Brasil têm reportado a

presença de *M. bovis* em rebanhos leiteiros, com prevalência de 1,4% em tanques de expansão (MANZI et al., 2018) e 3,03% em amostras de mastite clínica (JUNQUEIRA et al., 2017).

Diferentes espécies de micoplasmas podem causar mastites, com manifestações clínicas, subclínicas, ou ainda, casos crônicos com baixas taxas de cura ao tratamento (GONZÁLEZ e WILSON, 2003). Trata-se de uma infecção comum em países da Europa e nos Estados Unidos, com ocorrência de surtos principalmente relacionados à presença de *M. bovis*. Essa espécie é responsável por ocasionar problemas respiratórios, surtos de mastite clínica e acentuada queda na produção de leite em grandes rebanhos (AEBI et al., 2012; POTHMANN et al., 2015), por outro lado, em rebanhos com menor número de animais, as manifestações decorrentes da presença de *M. bovis*, ocorrem principalmente na forma de artrite e pneumonia em bezerras e novilhas (PFÜTZNER e SACHSE, 1996).

A transmissão de *M. bovis* se dá por contato direto com animais infectados. Os principais riscos de infecção ocorrem na introdução de novos animais no rebanho, podendo se dar a partir de procedimentos de reprodução, como inseminação artificial; ambiente de ordenha e equipamentos contaminados; transmissão por via aerógena ou ainda pessoas contaminadas em contato com os animais. Propriedades leiteiras que adotam procedimentos de biossegurança estão susceptíveis à entrada de *M. bovis* por meio da inseminação artificial com sêmen contaminado. Vacas inseminadas a partir de sêmen contendo esse patógeno correm o risco de desenvolverem mastite por esse agente (HAAPALA et al., 2018).

A coinfeção por mais de uma espécie de micoplasma ou ainda, outros micro-organismos pertencentes à classe Mollicutes, é comum em casos de mastite. Em estudo realizado por Al-Farha et al. (2017) em rebanho leiteiro da Austrália, os autores identificaram 76,7% (221/288) de casos positivos para espécies de micoplasmas, sendo 52,1% destes, coinfeção do gênero *Mycoplasma* com duas ou mais espécies, seguido por infecção única de *Acholeplasma laidlawii* (10,8%), *M. bovis* (6,2%), *M. bovirhinis* (5,6%), e *M. arginini* (2%).

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da mastite por micoplasmas é semelhante ao diagnóstico convencional, porém, quando relacionado com outros sinais clínicos no rebanho, como artrite e pneumonia, sugere-se a presença de *M. bovis* no rebanho (NICHOLAS et al., 2016).

O monitoramento do patógeno se torna dispendioso quando é realizado individualmente, sendo recomendado o monitoramento microbiológico do tanque ou amostra de leite composta de vários animais. A eliminação de micoplasmas no leite mastítico pode ocorrer em até 1×10^6 micoplasmas/mL de leite, o que permite a detecção de um animal infectado entre pelo menos 1000 animais (NICHOLAS et al., 2016), porém quanto maior o número de vacas que compõem a amostra de leite, menor será a sensibilidade na detecção.

Quando os micoplasmas estão presentes em baixas concentrações no leite é necessário concentrar a amostra de leite a partir da centrifugação e ressuspensão em solução salina, o que pode aumentar em até quatro vezes a detecção de uma amostra positiva (PUNYAPORNWITHAYA et al., 2009).

A identificação de micoplasmas no leite se dá por meio de cultivo microbiológico, considerado padrão ouro para detecção de infecções por este agente. De maneira geral, a técnica é simples, porém, são necessários meios de cultura com enriquecimento específico para as diferentes espécies envolvidas na etiologia das mastites, tornando o diagnóstico laborioso. Como exemplo, pode-se citar *M. arginini* que necessita da adição de arginina no meio de cultura para o seu crescimento (BROWN et al., 2011).

Espécies de *Ureaplasma* spp. no entanto, necessitam de um meio de cultura suplementado com ureia, ou ainda, meio de cultura específico para o isolamento (ROBERTSON e TAYLOR-ROBINSON, 2011).

Outro aspecto importante é a necessidade de um ambiente de microaerofilia com uma atmosfera de ao redor de 5% de CO₂. A maioria das espécies são anaeróbias facultativas, mas algumas são anaeróbias obrigatórias (BROWN et al., 2011).

Como citado anteriormente, um dos entraves no diagnóstico da mastite por micoplasma é a dificuldade no isolamento do agente devido às necessidades de crescimento de cada espécie. Outro fator limitante é o fato de apresentarem

um crescimento lento (7 a 10 dias em média) no meio de cultura. Nos primeiros dias de incubação pode ocorrer o crescimento de outros micro-organismos menos fastidiosos, resultando em contaminação, tornando difícil ou até mesmo impossível a identificação de espécies de micoplasmas envolvidas no leite mastítico. Deve-se considerar ainda, o fato de que o cultivo microbiológico não permite a diferenciação de espécies, sendo necessários testes adicionais para a identificação destas (CLOTHIER et al., 2010).

A coinfecção com mais de uma espécie de micoplasma, também dificulta o diagnóstico, sendo recomendada a implementação de um método diagnóstico capaz de detectar de forma rápida e eficiente mais de uma espécie de micoplasma simultaneamente (AL-FARHA et al., 2017).

O diagnóstico molecular permite a detecção de inúmeros genes e espécies, na dependência da padronização e uso de *primers* específicos para cada espécie. A PCR é a técnica mais utilizada em pesquisas moleculares, pois permite um resultado rápido, quando comparado ao cultivo microbiológico, e a possibilidade da identificação de diferentes espécies. Técnicas moleculares são muito utilizadas na identificação de micoplasmas envolvidos nas mastites, na busca de um diagnóstico rápido e preciso (BAIRD et al., 1999; AEBI et al., 2012; HIGUCHI et al., 2013).

Um alvo utilizado na detecção de *M. bovis* é o gene *uvrC*. Presente em *M. bovis* e *M. agalactiae*, é específico e bem conservado em ambas as espécies e não apresenta reação cruzada entre elas (FREY et al., 1999; CLOTHIER et al., 2010). *M. agalactiae* e *M. bovis* causam doenças distintas, possuem características fenotípicas semelhantes e apresentam apenas 40% de similaridade entre os seus DNAs; por outro lado, os seus 16S rRNA são muito próximos, com semelhança de 99,8% (NICHOLAS e AYLING, 2003).

Outra ferramenta molecular amplamente utilizada nas pesquisas é a PCR em tempo real. O procedimento é semelhante ao PCR convencional, mas ao contrário desta última, a primeira permite a quantificação do DNA amplificado em tempo real. O composto fluorescente adicionado à reação emite uma fluorescência no momento em que o DNA é amplificado durante os ciclos, podendo ser visualizado à medida que ocorre a reação (OLIVEIRA, 2010).

O uso da PCR em tempo real para a detecção de *M. bovis* nos rebanhos é uma ferramenta que permite o processamento de várias amostras em poucas

horas. A especificidade da técnica pode ser aumentada com o uso de sondas com sequências específicas de genes alvos altamente conservados dentro das espécies, permitindo a quantificação do micro-organismo em baixas concentrações e em tempo real durante a amplificação (CLOTHIER et al., 2010; SACHSE et al., 2010).

A pesquisa de *M. bovis* em amostras de leite, pela PCR em tempo real é muito utilizada em pesquisas (CAI et al., 2005; ROSSETI et al., 2010; SACHSE et al., 2010). A técnica apresenta resultados satisfatórios na identificação desse micro-organismo com maior sensibilidade de detecção quando comparado ao PCR convencional (BEHERA et al., 2018).

2.6 Prevenção e controle

Devido às suas características de resistência aos antimicrobianos, uma estratégia de controle e prevenção de doenças por micoplasmas é a vacinação. Em estudo experimental realizado por Nicholas et al. (2002) os autores observaram eficácia da vacinação na progressão de pneumonia em novilhas. Os autores desafiaram novilhas com *M. bovis* e após três semanas observaram que os animais desafiados apresentavam menos sinais clínicos compatíveis com pneumonia do que os não vacinados. A vacinação também diminuiu a disseminação desse patógeno para outros órgãos internos.

Bacterinas contendo *M. bovis* têm sido comercializadas nos EUA, para uso em novilhas na prevenção de doenças respiratórias.

No caso da detecção de casos de mastite por micoplasma, a medida de controle a ser tomada é a segregação ou descarte dos animais, evitando-se assim a disseminação da doença para animais sadios (NICHOLAS et al., 2016). A vacinação profilática de animais pode reduzir os casos de mastite por *M. bovis* pelo aumento da resposta imune nos animais (BOOTHBY et al., 1988). No Brasil não há vacinas disponíveis no mercado.

A Nova Zelândia é o primeiro país a tentar erradicar a doença em bovinos pela eliminação de mais de 100 mil vacas, sendo considerado o maior abate em massa da história do país. *M. bovis* foi inicialmente detectado no país em julho de 2017, sob a forma de mastite em vacas e casos de pneumonia e

conjuntivite, além de outras manifestações. Desde que o problema foi detectado, 26 mil vacas já foram eliminadas em 37 propriedades (ROY, 2018).

2.7 Tratamento

As mastites causadas por *M. bovis* apresentam-se de maneira geral crônicas, com quadros de debilidade e não responsivas ao tratamento. *M. bovis* é refratário ao grupo de antibiótico mais utilizado, os pertencentes à classe dos β -lactâmicos e naturalmente resistentes à polimixinas, sulfonamidas, ácido nalidíxico, trimetoprim e rifampicina. Algumas cepas de *M. bovis* vêm apresentando resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções crônicas, como oxitetraciclinas, tilmicocina e espectinomicina (AYLING et al., 2000).

Barberio et al. (2016) concluíram que o uso de antimicrobianos utilizados no tratamento da mastite bovina resultou em maiores índices de resistência de *M. bovis in vitro*. Por outro lado, concluíram que a resistência foi menor quando foram testados antimicrobianos não utilizados no tratamento de mastites.

Tem-se observado aumento na resistência de *M. bovis* aos antimicrobianos como: tetraciclinas, macrolídeos, lincosamidas, aminoglicosídeos, cloranfenicóis e fluoroquinolonas. Uma variação nos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi observada por Lysnyansky et al. (2016) para os diferentes isolados de *M. bovis*. Essa variação se deve principalmente aos países de origem dos isolados associado à administração de diferentes fármacos nos animais, em função dos protocolos de tratamento utilizados nesses países.

Uma opção para o direcionamento do tratamento é a determinação da CIM. Métodos para determinação da susceptibilidade *in vitro* de micoplasmas foram descritos pela primeira vez em 1967 (JAO, 1967). Verificou-se a necessidade de padronização de técnicas para ensaios antimicrobianos contra esses micro-organismos o que levou o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) a desenvolver uma série de estudos para o teste de susceptibilidade antimicrobiana de micoplasmas de origem humana.

Os testes *in vitro* utilizados para determinação da CIM são: o método de diluição em ágar, o método de diluição em caldo ou o E test[®]. Como citado

anteriormente, esses procedimentos são aprovados apenas para patógenos de amostras clínicas de origem humana (*M. hominis*, *M. pneumoniae* e espécies de *Ureaplasma*) (CLSI, 2011). Até o momento não há padronização dos testes para espécies de micoplasmas de origem animal, somente um guia de recomendações para o desenvolvimento da técnica (HANNAN, 2000).

Kits comerciais estão disponíveis na Europa e Estados Unidos para determinação rápida da CIM. Através do Mycofast[®], cepas de origem urogenital, como *Ureaplasma urealyticum* e *M. hominis* podem ser detectadas, identificadas, enumeradas e sua sensibilidade aos antimicrobianos determinada. O teste permite a identificação destas espécies após 24 horas de incubação, com mudança na coloração de meio líquido, resultante da metabolização da ureia e arginina presentes no meio.

A variedade de espécies de origem veterinária dificulta a padronização de um meio de cultura que possa ser utilizado de maneira ampla, porém, ágar ou caldo *Mycoplasma* apresentam bons resultados no isolamento da maioria das espécies. Acetato de tálio, penicilina ou outro β -lactâmico devem ser adicionados ao meio de cultura para a inibição do crescimento de microbiota contaminante. A utilização desses impedimentos pode ocasionar antagonismo ou sinergismo com outros antimicrobianos, porém em estudo *in vitro*, não foi demonstrada influência com espiramicina, estreptomicina, tetraciclina, tiamulina ou tilosina contra algumas espécies de micoplasmas de origem aviária (WHITHEAR et al., 1983).

Pelo exposto depreende-se a importância das diferentes espécies de micoplasmas tanto na patologia humana quanto na veterinária, e nesse caso, principalmente como patógenos envolvidos na mastite bovina, objeto desse estudo.

2.8 Justificativa

Considerando-se o provável subdiagnóstico da micoplasmose mamária bovina no Brasil, as dificuldades no diagnóstico, de tratamento e os aspectos de saúde pública, propôs-se o presente estudo com o intuito de identificar espécies de micoplasmas isoladas a partir de amostras de leite de vacas com mastite clínica, com ênfase na detecção de *M. bovis*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a participação de patógenos do gênero *Mycoplasma* spp. em amostras de leite de vacas com mastite clínica.

3.2 Específicos

Detectar a presença do DNA de *M. bovis* em amostras de leite de casos clínicos de mastite bovina, pelas técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real;

Obter isolados de micoplasmas por meio de cultivo microbiológico e identificar a espécie isolada pelo sequenciamento e análise filogenética;

Comparar a taxa de isolamento de micoplasmas em dois meios de culturas, Hayflick e SP4.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram avaliadas 1166 amostras de leite de vacas com mastite clínica, provenientes de nove propriedades leiteiras da região da bacia leiteira ABCW – Paraná e de uma propriedade localizada na região de São Pedro – São Paulo, identificadas de ‘A’ a ‘J’.

As amostras de leite avaliadas foram enviadas ao Núcleo de Pesquisa em Mastite (NUPEMAS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu para o diagnóstico de *Mycoplasma* spp. nos rebanhos, sendo portanto consideradas amostras de conveniência.

Antes da ordenha, após o pré-*dipping*, realizou-se em todas as vacas em lactação o teste de Tamis (caneca de fundo preto), a fim de se identificar casos de mastite clínica no rebanho com alterações no leite, como presença de grumos, pus, sangue ou leite em dessora. Após a confirmação dos casos clínicos, realizou-se a desinfecção do óstio do teto, com solução de álcool iodado a 0,5%.

Em seguida, foram colhidas amostras de ao redor de 5 mL de leite, em frascos estéreis, destinados especificamente para a realização de exame microbiológico. Imediatamente após a coleta, as amostras foram congeladas à -20°C e em seguida foram encaminhadas ao NUPEMAS por empresa de transporte terrestre, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo material refrigerado reciclável.

4.2 Análises moleculares

4.2.1 Extração do DNA

Após o recebimento das amostras, alíquotas de 1 mL de leite foram mantidas em microtubos livre de DNase e RNase para a extração do DNA bacteriano. A extração do DNA foi procedida seguindo o método de termólise descrito por Fan et al. (1995), com algumas modificações que seguem:

inicialmente, os microtubos foram centrifugados em microcentrifuga Eppendorf® a 12000 RPM (rotações por minuto) por dez minutos; após essa etapa, foi descartado o sobrenadante, mantendo-se o *pellet* ao fundo. Posteriormente foi retirada a gordura retida no microtubo, com auxílio de um *swab* estéril. Adicionou-se 500µL de tampão fosfato salino (150 mM PBS pH 7,2) ao *pellet* e centrifugou-se novamente a 12000 RPM por dez minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 50 µL de água ultrapura. As amostras foram mantidas em banho-maria a 100°C por dez minutos e após esse período, foram imediatamente submersas em gelo por cinco minutos. Em uma etapa final, foram centrifugadas a 12000 RPM por dez minutos e o sobrenadante armazenado em temperatura de 4°C por 24 horas para estabilização do DNA e, posteriormente congeladas a -20°C até o momento da amplificação.

Uma etapa adicional para purificação do DNA foi realizada posteriormente. A purificação consistiu na adição de 10% do volume recuperado de solução de acetato de sódio 3M. Em seguida adicionou-se 2,5x do volume recuperado de etanol 100% gelado (4°C) e o material foi mantido à -20°C por uma noite, para precipitação. O volume recuperado foi centrifugado a 12000 RPM por 15 minutos e o sobrenadante descartado. A seguir, o *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado e centrifugado a 12000 RPM por 15 minutos, essa etapa foi realizada duas vezes. O *pellet* foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida adicionou-se 50 µL de água ultrapura para realização da PCR em tempo real.

4.2.2 PCR para detecção de *Mollicutes* e *Mycoplasma bovis*

A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®). A reação foi preparada conforme segue: 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada *primer*, 7,5 µL de água ultra-pura (Gibco®) e 3 µL de DNA extraído, para um volume final de 25 µL.

A amplificação do DNA de *Mollicutes* foi realizada utilizando-se os *primers* genéricos GPO-3 (5' GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T 3') e MGSO (5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CT 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. Como controle positivo utilizou-se uma cepa de referência *M. arginini* (ATCC 23838 G230 – FIOCRUZ).

Uma vez positivas à PCR com *primers* genéricos, foi realizada a amplificação do DNA de *M. 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: 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por um minuto, 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por 3 minutos. Como controle positivo utilizou-se uma cepa de referência *M. bovis* Donetta (ATCC 25523).

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-Aldrich®). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) em voltagem de 100V por 25 minutos. Após o término da corrida, o gel foi visualizado em transluminador de luz UV (MANXATIS 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®).

4.2.3 Detecção de *Mycoplasma bovis* por PCR em tempo real

A etapa de PCR em tempo real foi realizada no Laboratório de Micoplasmas do ICB II da Universidade de São Paulo – USP, campus São Paulo.

Os *primers* e as sondas foram projetados para o gene *uvrC* de *M. bovis*. *Primers* Mbov F2024: (5' TCT AAT TTT TTC ATC ATC GCT AAT GC 3'), Mbov R2135: (5' TCA GGC CTT TGC TAC AAT GAA C 3') e sonda Mbov *uvrC*: FAM - AAC TGC ATC ATA TCA CAT ACT - MGB foram adquiridos de fontes comerciais. Os *primers* amplificam um fragmento de gene *uvrC* com um produto de 112 pares de base e mostram especificidade para *M. bovis* usando GenBank (CLOTHIER et al., 2010).

Taqman[®] PCR em tempo real foi realizada em equipamento Applied Biosystems Step One[®] (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). A reação de PCR em tempo real foi realizada conforme segue: 12,5 µL TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10 µM de cada *primer*, 10 µM de sonda TaqMan[®], 20 ng ou 1 µL de DNA extraído, água destilada ultra-pura (Gibco[®]) para um volume final de 25 µL. O seguinte perfil de ciclos foi utilizado: 10 min a 95°C seguido de 40 ciclos de denaturação a 95°C por 15 seg, e anelamento e amplificação a 60°C por 1 min.

Para a determinação da sensibilidade da reação de PCR, foram realizadas diluições seriadas da cultura pura de *M. bovis* Donetta. Preparou-se 50 mL de caldo SP4 inoculado com *M. bovis* Donetta, após o crescimento a 37° em estufa de CO₂ por cinco dias e o conteúdo foi centrifugado por 30 min a 15000 RPM. O *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de PBS e procedida a extração com kit comercial (Macherey-Nagel[®]), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração avaliou-se a concentração do DNA, que foi de 857,805 ng/µL. Utilizou-se o endereço eletrônico <cels.uri.edu/gsc/cndna.html> para calcular o número de cópias do DNA e proceder as diluições.

Todas as reações foram realizadas em duplicata, em placas de 96 poços, seladas com filme de vedação ótica. O cálculo da linha limiar (threshold) foi fixado em 0,02. Amostras com valores inferiores a 0,02 com menos de 35 ciclos foram consideradas positivas.

4.3 Isolamento em meio Hayflick e SP4 suplementado

Realizou-se o cultivo microbiológico em meio de cultura Hayflick e SP4 de todas as amostras positivas à PCR convencional para a classe Mollicutes.

Para isolamento de *Mycoplasma* spp., foi realizado cultivo de 10µL de cada amostra de leite, em placas de Petri contendo meio sólido Hayflick suplementado, conforme descrito por Whitford (1994) e acrescido de acetato de tálio a 0,01% (GONZÁLEZ e WILSON, 2003). O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se o meio de cultura SP4 suplementado, de acordo com Tully (1995).

A incubação foi procedida em ambiente de microaerofilia a 5%, em estufa de CO₂, com posterior observação do isolamento microbiano 3, 5, 7 e 10 dias após incubação.

O acompanhamento do crescimento microbiano foi realizado em lupa estereoscópica (Modelo ZEISS SteREO Discovery.V8), em aumento de 4x, considerando-se como positivas aquelas com presença de colônias de aspecto característico de “ovo frito” (PRETTO et al., 2001).

Uma vez positivas no isolamento em meio sólido, foi realizado o reisolamento a partir de uma colônia em caldo PPLO acrescido de arginina 0,1%. Na observação microscópica identificou-se a colônia a ser isolada e realizou-se marcação com caneta do tipo permanente na superfície da placa de Petri. Em seguida, a colônia foi retirada, juntamente com o meio de cultura e cultivada em caldo PPLO para promoção do crescimento.

Após cinco dias de incubação em estufa de CO₂, realizou-se a extração do DNA dos isolados para realização da PCR convencional a fim de identificar a espécie isolada.

4.4 Sequenciamento dos nucleotídeos

Os isolados obtidos a partir do cultivo microbiológico foram submetidos à PCR e os produtos sequenciados para análise das espécies envolvidas.

Os *primers* MGSO e GPO-3 descritos anteriormente, foram utilizados para amplificar a região 16S rRNA de micro-organismos da classe Mollicutes. Os produtos obtidos da PCR foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1,5% para confirmar a presença de apenas um fragmento/banda.

O produto foi purificado utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e quantificado em gel de agarose utilizando-se o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®).

Após a purificação, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Diagnóstico Molecular e Sequenciamento do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) – UNESP/Botucatu e foram submetidas ao sequenciamento automático de DNA pelo método de Sanger (Applied Biosystems, ABI 3500®).

4.5 Edição das sequências e análise filogenética

As sequências *sense* e *antisense* obtidas na forma de eletroferograma foram visualizadas no software Chromas versão 2.6.5 (Technelysium Pty Ltd 1998-2018©), sendo checadas manualmente para remoção das extremidades e identificação de erros ou discrepâncias. A seguir, as sequências foram submetidas ao BLASTn (*nucleotide basic local alignment search tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), a fim de confirmar a identidade dos produtos obtidos na PCR.

As sequências obtidas foram submetidas ao alinhamento múltiplo pelo método ClustalW no programa MEGA X (KUMAR et al., 2018), juntamente com outras 13 sequências de oito diferentes espécies de micoplasmas, incluindo espécies cujo isolamento a partir de leite bovino é relatado em literatura (GIOIA et al., 2016). Também foi incluída a sequência da cepa de *M. bovis* utilizada como controle positivo nos ensaios de PCR. O alinhamento foi editado manualmente para correção de erros óbvios.

A reconstrução filogenética também foi realizada no programa MEGA X pelo método Maximum Likelihood, utilizando-se o modelo de substituição Kimura 2-parameter, assumindo-se que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 66,24%) (KIMURA, 1980). Este modelo de substituição foi definido como o mais apropriado ao banco de dados, determinado pelo procedimento de seleção de modelo no MEGA X, sendo selecionado aquele com menor *score* sob o critério de informação Bayesiano (BIC – Bayesian information criterion).

A árvore *consenso* foi inferida a partir de 1000 replicatas de Bootstrap (FELSENSTEIN, 1985). As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente, aplicando-se algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ em uma matriz de distâncias entre pares estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL), selecionando-se, então, a topologia com valor superior de log likelihood.

4.6 Determinação do número de isolados do agente e análise estatística

Para determinação do número de cepas de *Mycoplasma* spp. a serem utilizadas no estudo, utilizou-se um cálculo de sensibilidade de 85% como uma precisão de mais ou menos 10% e Alfa 5%, sendo necessárias para o estudo um total de 50 amostras (MACHIN et al., 2017).

O teste de McNemar foi utilizado para determinar a associação de duas variáveis categóricas dependentes na comparação entre a taxa de isolamento nos meios de cultura Hayflick e SP4. As análises estatísticas foram realizadas com SAS 9.2 (PROC FREQ; SAS Institute, 2011) com nível de significância estatística de 0.05.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados das análises moleculares

Das 1166 amostras de leite de casos de mastite clínica analisadas, 8,6% (100/1166) foram positivas na detecção molecular para a classe Mollicutes.

Ao se pesquisar a presença de *M. bovis* nas 100 amostras positivas para Mollicutes, obteve-se 13% (13/100) de positividade à PCR convencional enquanto à PCR em tempo real, obteve-se 11% (11/100). A positividade em pelo menos uma das análises moleculares foi de 16%, em cinco das dez propriedades avaliadas.

Três amostras foram negativas à PCR convencional, entretanto, positivas na PCR em tempo real. Oito amostras foram positivas em ambos os testes moleculares. Cinco amostras foram negativas à PCR em tempo real e positivas à PCR convencional (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados gerais das análises moleculares para *Mycoplasma bovis* e cultivo microbiológico de amostras de leite de casos de mastite clínica bovina. Botucatu, 2018.

Identificação	PCR	PCR em		
Propriedade	Convencional	Tempo Real	Hayflick	SP4
A	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
A	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
A	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
A	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
A	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
B	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
B	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
B	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
C	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
D	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
D	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
D	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
F	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
F	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
F	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
F	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
F	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

As propriedades classificadas como E, G, H, I e J não revelaram amostras positivas na pesquisa de *M. bovis*, assim sendo, não foram incluídas na Tabela 1.

Considerando-se que foram utilizadas amostras de conveniência de um total de dez propriedades, com pelo menos uma amostra de leite positiva para o agente, tem-se que 50% (5/10 – A, B, C, D e F) das propriedades foram positivas na pesquisa de *M. bovis* quando avaliadas pelas técnicas moleculares.

Pela análise da Tabela 1 depreende-se que 16 amostras de leite foram positivas em ao menos um dos testes moleculares realizados, não sendo necessariamente positivas nos dois testes simultaneamente.

A Figura 2 representa o gráfico de amplificação da curva padrão para detecção de *M. bovis* pela PCR em tempo real. Na imagem é possível observar a eficiência da reação por meio da análise da regressão linear (r^2), em que o valor obtido foi $>0,99$, ideal para que a reação seja validada.

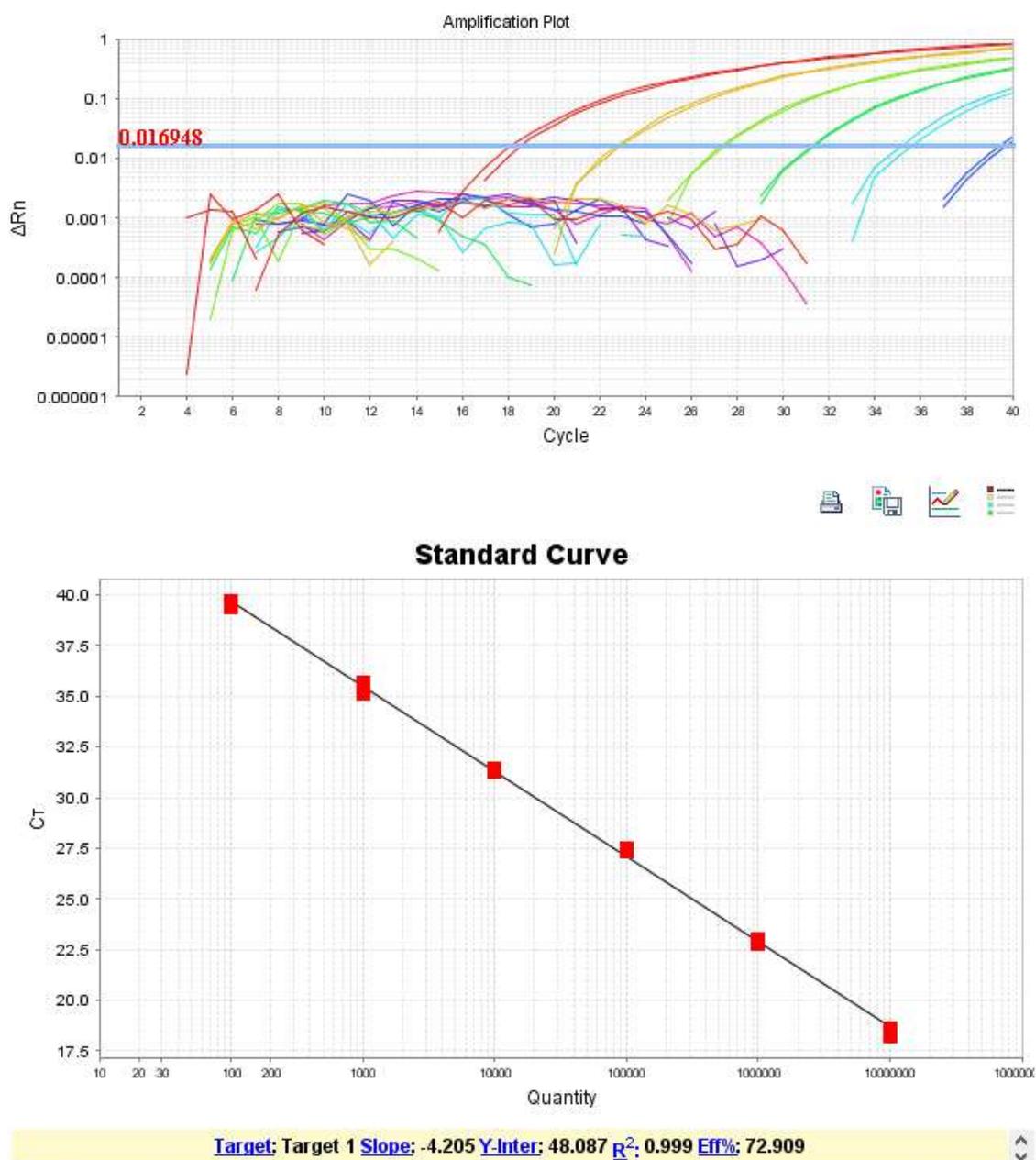


Figura 2: Gráfico de amplificação da curva padrão à PCR em tempo real.

5.2 Resultados das análises microbiológicas

Todas as amostras de leite positivas à PCR para a classe Mollicutes foram cultivadas em meio de cultura Hayflick modificado e em meio SP4 suplementado. Obteve-se 6% (6/100) de isolamento para o gênero *Mycoplasma* no meio de Hayflick e 11% (11/100) no SP4, sendo que, todas as amostras positivas no meio de Hayflick foram também positivas no meio SP4.

O meio de cultura SP4 se mostrou superior para o isolamento do gênero *Mycoplasma* ($P=0,0253$), ou seja, a chance de isolamento de *Mycoplasma* spp. no meio SP4 foi 18,8 vezes maior que no meio Hayflick (IC 95% = 8,01 - 44,05).

Uma amostra foi negativa nos dois testes moleculares para a detecção de *M. bovis* a partir da amostra clínica do leite, e positiva no cultivo microbiológico. Em seguida, realizou-se a PCR convencional do isolado obtido no cultivo, e o mesmo foi positivo para *M. bovis*.

Três amostras analisadas foram positivas em todos os testes realizados: PCR convencional e tempo real; cultivo nos meios de cultura Hayflick e SP4.

No cultivo microbiológico, verificou-se um padrão de crescimento com mais de uma colônia diferente, sendo assim, realizaram-se sucessivos repiques para reisolamento das colônias a fim de se obter um padrão único para a realização da PCR (Figura 3).

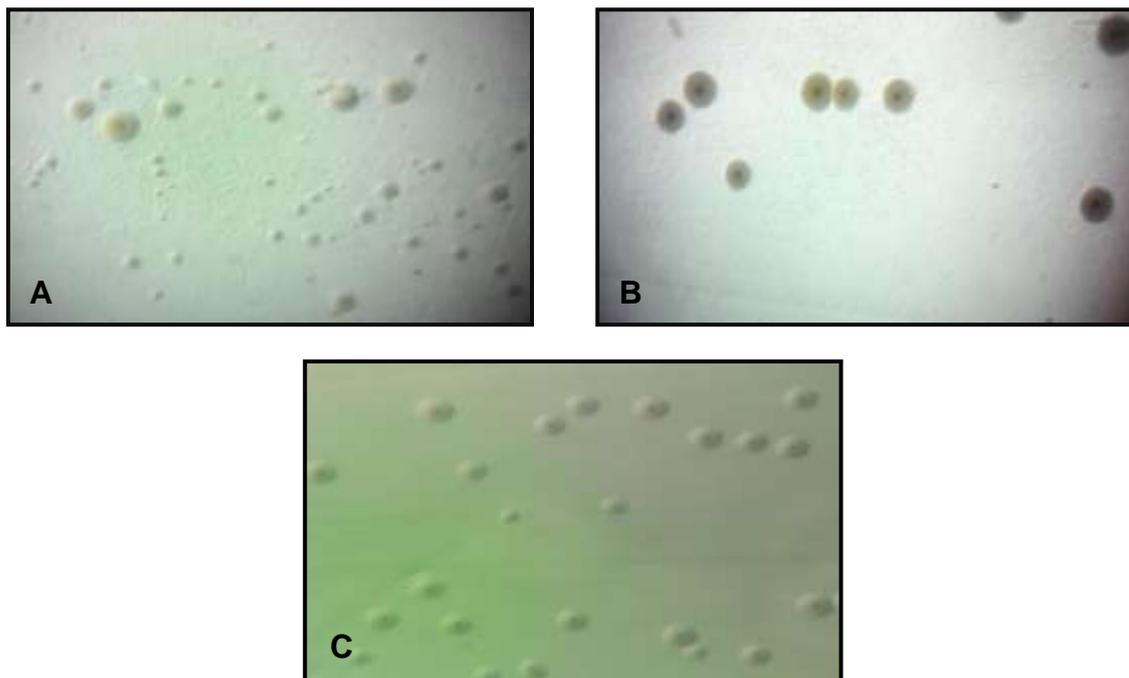


Figura 3: A: Cultivo microbiológico evidenciando mais de um padrão de colônia. B: Cultivo microbiológico após sucessivos reisolamentos, evidenciando padrão único de colônia. C: Controle positivo *Mycoplasma bovis* Donetta. NUPEMAS, FMVZ, 2018.

A partir dos isolados obtidos, foi realizada a PCR convencional para confirmação de *M. bovis*, e obteve-se 81,1% (9/11) de amostras positivas e 18,9% (2/11) negativas. Todas as amostras amplificadas com o *primer* universal 16S rRNA resultaram em um produto de 270 pares de base. Na Figura 4, observa-se a imagem obtida a partir da eletroforese em gel de agarose demonstrando os produtos de *M. bovis* e Mollicutes.

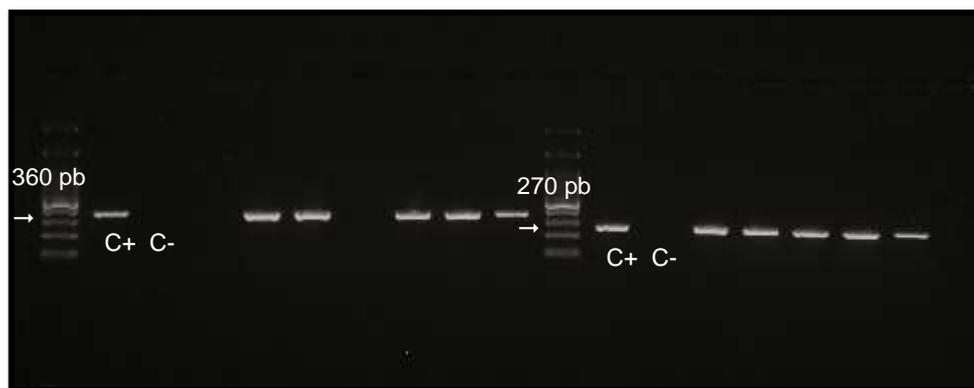


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% demonstrando os produtos amplificados de *Mycoplasma bovis* e Mollicutes, obtidos de isolados em caldo PPLO. Identificação pelo método de PCR convencional, com produto de 360 pares de base (pb) e 270 pb, para *Mycoplasma bovis* e Mollicutes, respectivamente. Controle positivo: *Mycoplasma bovis* Donetta (ATCC 25523); Controle Negativo: Água ultra pura.

5.3 Análise do gene 16S rRNA dos isolados

A partir do produto amplificado e realização do sequenciamento, 100% dos isolados foram agrupados com similaridade para *M. bovis* (Figura 5), confirmando os resultados obtidos na PCR, excetuando duas amostras que não amplificaram à PCR para o agente. Os dois isolados negativos à PCR convencional, também foram agrupados em *M. bovis*.

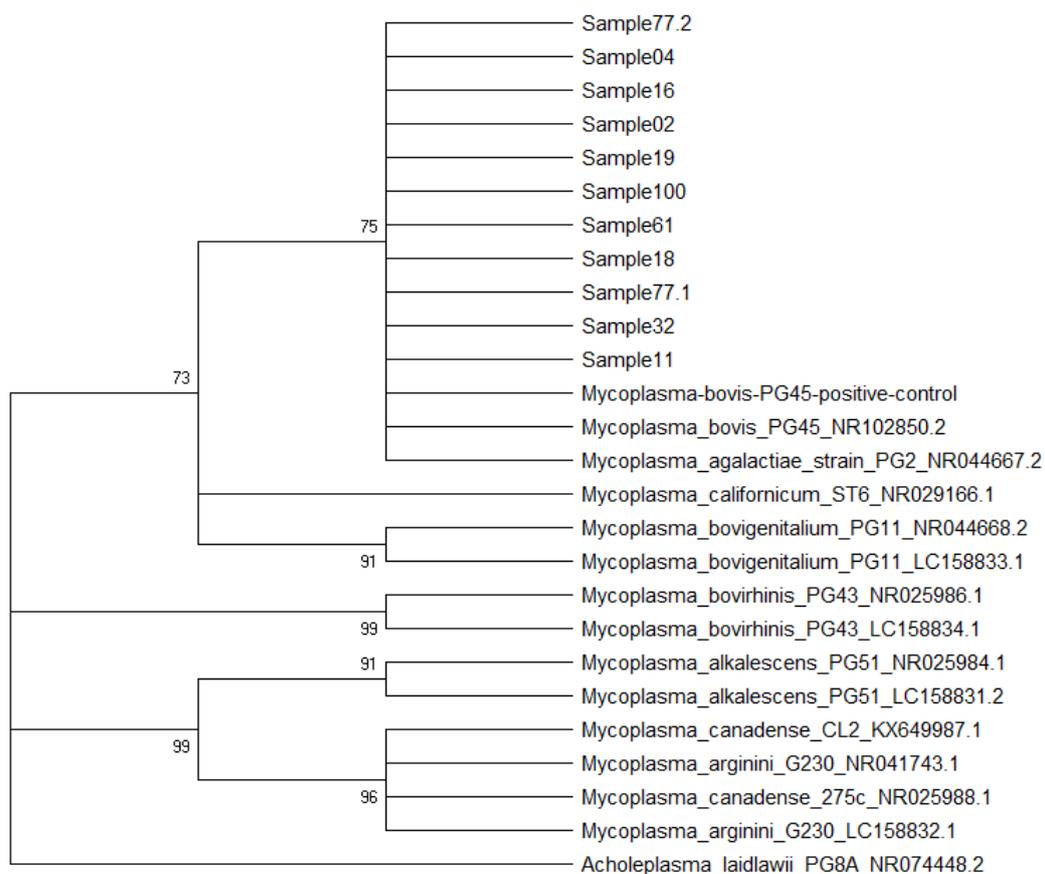


Figura 5: Análise filogenética de 11 isolados de *Mycoplasma bovis* obtidos de casos de mastite clínica bovina, identificados na imagem com a palavra “sample” seguida do número de identificação de cada amostra. As sequências de diferentes espécies de micoplasmas incluídas na análise estão identificadas com o número de acesso na base de dados do GenBank. Árvore condensada obtida a partir de 1000 replicatas de *Bootstrap* pelo método Maximum Likelihood. Ramificações correspondentes a partições reproduzidas em menos de 70% de réplicas de *Bootstrap* são colapsadas. A sequência de *Acholeplasma laidlawii* foi utilizada como *Outgroup*.

6 DISCUSSÃO

6.1 Detecção molecular

A presença de *M. bovis* em rebanhos leiteiros é relatada na literatura (AEBI et al., 2012; HIGUCHI et al., 2013; NICHOLAS et al., 2016; AL-FARHA et al., 2017). Os resultados do presente estudo reportam a ocorrência de 11% de positividade para *M. bovis* pela técnica de PCR em tempo real e 13% na PCR convencional. Os resultados moleculares para detecção de *M. bovis* pelas técnicas moleculares (11% e 13%) se mostraram próximos aos obtidos no cultivo microbiológico (11%), esse último considerado como padrão ouro para detecção em amostras clínicas.

A prevalência de *M. bovis* nos rebanhos varia de acordo com os estudos. Al-Farha et al. (2017) obtiveram 76,7% de amostras de leite positivas para *Mycoplasma* spp., sendo 6,2% delas, *M. bovis*. Em estudo realizado em rebanhos do Japão, a prevalência de *M. bovis* foi maior que de outras espécies obtidas naquele estudo, representando 59,7% dos isolados (HIGUCHI et al., 2013).

A pesquisa de *M. bovis* em amostras de leite bovino é amplamente realizada devido à maior prevalência e importância desse patógeno na etiologia das mastites. No presente estudo, obteve-se 16% (16/100) de amostras de leite positivas em ao menos um dos testes moleculares realizados para a detecção de *M. bovis*.

No Brasil não há relatos sobre a ocorrência de outras espécies de micoplasmas na etiologia das mastites, somente de *M. bovis*. O objetivo do presente estudo seria elucidar as espécies envolvidas a partir do sequenciamento, porém, só se encontrou a espécie *M. bovis*. Frente a esse resultado, ressalta-se a necessidade de utilização de *primers* específicos para a identificação de outras espécies de micoplasmas que foram positivas para a classe Mollicutes e, negativas para *M. bovis*.

Sugere-se a presença de algum inibidor da PCR presente no leite de uma amostra avaliada. A referida amostra clínica foi positiva na detecção de Mollicutes e negativa nas duas técnicas moleculares para detecção de *M. bovis*, entretanto, foi positiva no cultivo microbiológico para aquela espécie. Tal

fato sugere um resultado falso-negativo para *M. bovis* a partir da análise do leite. A possibilidade de baixa concentração do DNA de *M. bovis* na amostra clínica pode ser a causa desse achado.

Os inibidores podem ser de origem da própria amostra ou, podem ser introduzidos durante alguma etapa da reação. Amostras de leite possuem naturalmente cálcio e gordura em sua composição, que podem inibir a PCR dependendo das concentrações presentes, interferindo na eficiência da amplificação (SCHRADER et al., 2012). Powell et al. (1994) encontraram no leite um inibidor natural da *Taq* polimerase, a plasmina, que pode inibir a amplificação do DNA.

A dificuldade na diferenciação das espécies *M. agalactiae* e *M. bovis* a partir da sequência de seus 16s rRNA se deve à elevada similaridade encontrada entre elas (KÖNIGSSON et al., 2002; BASHIRUDDIN et al., 2005). Entre os isolados obtidos no presente estudo, duas amostras não amplificaram na PCR convencional para *M. bovis*, porém, amplificaram a partir da amostra clínica de leite para o mesmo agente. Na análise do sequenciamento, as duas amostras agruparam no *cluster* para *M. bovis* e *M. agalactiae*, pela similaridade entre essas espécies. Frente aos resultados moleculares obtidos a partir das amostras clínicas, sugere-se que se trata de *M. bovis*, mesmo sem a amplificação do isolado.

A epidemiologia da ocorrência dessas duas espécies (*M. bovis* e *M. agalactiae*) nos animais é distinta. A primeira ocorre em bovinos, causando principalmente mastite, pneumonia e artrite (P FÜTZNER e SACHSE, 1996) e a segunda, em pequenos ruminantes, responsável pela agalaxia contagiosa (GONZÁLEZ et al., 1995). Há relato sobre a ocorrência de *M. agalactiae* em touros, com acometimento ocular, cerebral e auditivo (CATANIA et al., 2016) porém em quadros de mastite, não há relato até o momento.

A ocorrência de *M. bovis* em pequenos ruminantes é incomum, embora possa ocasionalmente ser isolado de pulmões de caprinos. Um fator de risco associado à presença de *M. bovis* em caprinos é o fornecimento de leite bovino a cabritos jovens como suplementação alimentar, podendo este micro-organismo colonizar a cavidade oral, orofaringe, traqueia e pulmões (DAMASSA et al., 1992). As propriedades avaliadas no presente estudo são altamente tecnificadas para a produção de leite bovino e não criam

concomitantemente caprinos ou ovinos, sendo, portanto pouco provável a ocorrência de mastite bovina por *M. agalactiae*, fato que deverá ser melhor investigado em novos estudos.

Os *primers* utilizados no presente estudo para detecção de *M. bovis* pela PCR convencional demonstra especificidade melhorada para essa espécie (GONZÁLEZ et al., 1995). Na amplificação de *M. bovis* pela PCR em tempo real, as duas amostras clínicas referentes aos isolados que não amplificaram para *M. bovis* foram positivas. O *primer* utilizado para essa reação tem como alvo o gene *uvrC* que é altamente conservado nessa espécie (THOMAS et al., 2004; CLOTHIER et al., 2010), sendo assim, sua utilização garante resultados satisfatórios na amplificação desta espécie.

A análise molecular a partir de amostras de leite é uma ferramenta que facilita a detecção de patógenos envolvidos nas mastites. A qualidade do DNA extraído influencia diretamente nos resultados da PCR, podendo gerar resultados falso-negativos em alguns casos. Diferentes métodos de extração de ácido nucleico a partir de amostras de leite têm sido descritos (VOLK et al., 2014) a fim de proporcionar opções no momento da escolha de acordo com as necessidades de cada pesquisador.

O método de extração por termólise é uma opção simples e não onerosa, mas resulta em um DNA de qualidade inferior aos de kits comerciais, com presença de proteínas ou outros inibidores da PCR. No entanto, é uma técnica totalmente exequível para diagnóstico de *Mycoplasma* no leite, com bons resultados obtidos e já padronizados no nosso laboratório. Optou-se por realizar a extração por esse método, seguida de protocolo de purificação do DNA para obtenção de um material analítico de melhor qualidade, considerando-se os custos e praticidade do método.

Estudos reportam a eficiência dos protocolos de extração por kits comerciais em amostras de leite, sem interferência na qualidade do DNA resultante na maioria deles (QUIGLEY et al., 2012; USMAN et al., 2014; DIBBERN et al., 2015). Na realização da PCR convencional, é possível a utilização da extração por termólise com resultados satisfatórios na detecção de *M. canadense* e *M. californicum* a partir de isolados de amostras de leite (TAMIOZZO et al., 2014).

No presente estudo não foi avaliada a eficiência do DNA, e não foram comparados os protocolos de extração por termólise com outros protocolos, sendo assim não se pode afirmar a possibilidade de resultados falso-negativos devido à baixa qualidade do DNA, considerando-se o protocolo de extração de DNA utilizado.

A PCR em tempo real é capaz de amplificar regiões específicas do genoma bacteriano a partir de quantidades mínimas de DNA (VALASEK e REPA, 2005), sendo mais sensível do que a PCR convencional. Porém, essa sensibilidade depende diretamente da qualidade do DNA genômico. Templeton et al. (2003) compararam técnicas de diagnóstico para a detecção de *M. pneumoniae* e concluíram que a PCR em tempo real é mais sensível, específica e claramente superior à PCR convencional na detecção do patógeno em amostras oriundas de pacientes adultos com infecção do trato respiratório inferior.

A sensibilidade e especificidade das técnicas de PCR convencional e em tempo real para *M. bovis* não foram avaliadas no presente estudo, porém, resultados similares foram obtidos, com 13% e 11% de positividade.

Uma das limitações na realização da PCR em tempo real é a técnica de pipetagem, estando diretamente relacionada com os resultados. Erros de pipetagem podem resultar em variações na quantidade de DNA ou reagente adicionados à reação. Baixas concentrações de DNA podem gerar resultados falso-negativos, diminuindo a sensibilidade da técnica (DIBBERN et al., 2015). Essa consideração pode ser uma das justificativas frente aos resultados negativos à PCR, entretanto, positivos no cultivo microbiológico.

No presente estudo utilizou-se o protocolo de purificação do DNA extraído para a realização da PCR em tempo real, para reduzir a presença de inibidores. Foram obtidas três amostras positivas na PCR em tempo real, mas negativas na PCR convencional. Esse resultado pode ser justificado pela presença de inibidores naturais do leite, como a plasmina ou íons de cálcio (SCHRADER et al., 2012) ou ainda pela maior sensibilidade da PCR em tempo real como relatada por Templeton et al. (2013).

No Brasil, não há estudos que definam a etiologia da micoplasmose mamária, o que torna difícil a comparação da ocorrência das espécies prevalentes no país. A literatura disponibiliza dados apenas relacionados à

ocorrência de *M. bovis* nos rebanhos leiteiros. Em tanques de expansão de leite, Manzi et al. (2018) obtiveram 1,4% de prevalência de *M. bovis*, em 67 amostras de tanques analisadas. Junqueira et al. (2017) analisaram amostras de leite de casos de mastite clínica, e encontraram a ocorrência de 3% de *M. bovis* utilizando a técnica de PCR convencional.

Em outros países, a ocorrência de outras espécies de micoplasmas é avaliada. Em estudo no Japão, Higuchi et al. (2013) isolaram 89% (184/208) de quartos mamários infectados com apenas uma espécie de micoplasma, sendo elas: *M. bovis*, *M. alkalescense*, *M. californicum*, *M. arginini*, *M. canadense*, *M. bovirhinalium* e *M. adleri*. O restante dos quartos apresentaram coinfeção com mais de uma espécie de micoplasma. A espécie mais frequente foi *M. bovis*.

No estado de Nova Iorque - EUA, a prevalência de *M. bovis* é maior entre outras espécies de micoplasmas. Gioia et al. (2016) relatam a prevalência das seguintes espécies da classe Mollicutes, causando mastite: 1% de *M. bovirhinalis*, 2% de *A. oculi*, 2% de *M. arginini*, 3% de *M. californicum*, 10% de *M. canadense*, 10% de *M. bovirhinalium*, 11% de *A. laidlawii*, 17% de *M. alkalescens* e 78% de *M. bovis*.

6.2 Cultivo microbiológico

No cultivo microbiológico pode ocorrer o isolamento de uma ou mais colônias morfológicamente distintas, indicando a possibilidade de coinfeção por mais de uma espécie de *Mycoplasma*. Para a caracterização do agente, recomenda-se, a realização de clonagem, por sucessivos reisolamentos até que se obtenha apenas um padrão de colônia. Higuchi et al. (2013) obtiveram 12% de quartos mamários infectados com duas ou mais espécies de micoplasmas ocorrendo simultaneamente.

No presente estudo, uma amostra de leite apresentou dois padrões de crescimento em meio de cultura sólido. Após o isolamento de duas colônias com morfologia distintas, observou-se pela PCR, que ambas eram *M. bovis*, descartando-se a suspeita de coinfeção com mais de uma espécie, nesse caso.

Foram obtidas colônias de *M. bovis* em 11% das amostras de leite no meio de SP4 e 6% no de Hayflick, confirmadas pela PCR convencional. Sabe-se da dificuldade do isolamento de *Mycoplasma* spp. em meios de cultura pelas características relacionadas às diferentes espécies. Para aumentar a possibilidade de detecção de outras espécies, no presente estudo foram utilizados dois meios de cultura distintos, mas não houve o isolamento de outras espécies de micoplasma, e tão somente de *M. bovis*.

O meio de Hayflick modificado é recomendado para o isolamento de *M. bovis* em amostras de leite (PFÜTZNER et al., 1996), e tem sido utilizado por vários autores com sucesso (PRETTO et al., 2001; CAI et al., 2005; RIEKERINK et al., 2006). A utilização de mais de um meio de cultura pode aumentar a taxa de isolamento de micoplasmas, como observado por Lai et al. (1986) ao compararem os meios de Chalquest e de Hayflick na detecção de *M. pulmonis*, com 92% e 66% de isolamento, respectivamente.

O presente estudo revelou positividade para *M. bovis* de 16% em pelo menos um dos testes moleculares, enquanto ao cultivo microbiológico, a positividade foi 11%. Mesmo com a utilização de dois meios de cultura, obteve-se um elevado percentual de amostras negativas no cultivo microbiológico, total de 89%, sugerindo a possibilidade de inviabilidade celular, considerando que são amostras previamente positivas para a classe Mollicutes.

As amostras utilizadas neste estudo foram de conveniência, ou seja, encaminhadas para diagnóstico de *Mycoplasma* spp. em diferentes rebanhos. Todas as amostras foram recebidas congeladas e foram mantidas em temperatura de congelamento por período de até um mês, para serem processadas. A menor taxa de isolamento pode estar associada além do requerimento nutricional das diferentes espécies envolvidas nas mastites, também ao congelamento, com conseqüente redução da carga microbiana viável, redundando em resultados falso-negativos no cultivo microbiológico.

O meio de cultura SP4 é mais rico em sua composição quando comparado ao Hayflick e foi capaz de detectar 18,8 vezes mais o agente que este último. Sendo assim, seria possível a detecção de outras espécies com necessidades nutricionais superiores a do *M. bovis*, a única espécie com crescimento no meio SP4.

O congelamento do leite pode reduzir a concentração bacteriana em 1-2 \log_{10} unidades formadoras de colônia no leite. As amostras utilizadas no presente estudo foram provenientes de casos de mastite clínica e espera-se que possuam uma maior carga microbiana do agente que nas amostras de leite de tanques de expansão, por exemplo. O congelamento e descongelamento repetidamente causa uma diminuição no número de micro-organismos viáveis, com impossibilidade de recuperação (PARKER et al., 2018), a partir do cultivo microbiológico.

Tortorelli et al. (2017) obtiveram apenas um resultado positivo no isolamento em meio de Hayflick em 32 secreções provenientes de doença respiratória bovina, salientando um baixo percentual de isolamento quando comparado à outros estudos. Os autores observaram também que frequentemente o resultado do isolamento bacteriano não está associado à positividade à PCR, com resultados de culturas negativas e moleculares positivos, fato também observado no presente estudo.

A ocorrência de resultados negativos ao cultivo microbiológico concomitante com resultado positivo à PCR é relatada na literatura (FÉRANDON et al., 2011). A positividade no cultivo microbiológico é variável de acordo com a literatura. A utilização de mais de um tipo de meio de cultura pode influenciar na positividade dos resultados, pois, sabe-se que as espécies de micoplasmas apresentam diferenças quanto às exigências para o seu desenvolvimento. Férandon et al. (2011) obtiveram 29,4% (45/153) de positividade no cultivo microbiológico, superior ao obtido no presente estudo, que foi de 11%, e pode estar relacionado à qualidade e viabilidade celular das amostras analisadas.

Justice-Allen et al. (2011) realizaram a comparação entre a detecção de espécies de micoplasmas de tanques de expansão por meio de cultivo microbiológico e por PCR em tempo real. Dentre os resultados positivos no cultivo microbiológico, 17,7% (11/62) foram negativos na PCR. No presente estudo, uma amostra foi positiva no cultivo e negativa na PCR convencional e tempo real para *M. bovis*. No entanto, foi positiva na PCR convencional para *M. bovis*, de colônia isolada do leite. Nesse caso, a ocorrência de inibidores da *Taq polimerase* no leite em casos de mastite clínica, pode revelar resultados

negativos à PCR, ou ainda, no momento da coleta da amostra a concentração de DNA de *M. bovis* no leite, pode não ter sido suficiente para detecção.

Posteriormente, a concentração de DNA foi aumentada com a realização do repique de uma colônia para caldo PPLO, possibilitando a sua detecção. Esse fato também foi relatado por Baird et al. (1999), que obtiveram quatro amostras positivas no cultivo entretanto, negativas na PCR, mas como no presente estudo, não se investigou o motivo desse resultado.

É de se esperar que os resultados da PCR superem a positividade do cultivo microbiológico, considerando que o primeiro detecta DNA degradado de micoplasmas não viáveis, ou ainda, culturas negativas podem conter uma baixa concentração de DNA não sendo detectáveis na PCR. Essa positividade superior foi observada no presente estudo, com 89% de amostras negativas no cultivo microbiológico.

O elevado percentual de amostras negativas no cultivo pode se dar principalmente pela possibilidade de inviabilidade celular ou ao meio de cultura não ser específico para todas as espécies do agente, considerando que só se identificou *M. bovis* na PCR. Além desses aspectos, deve-se considerar a possibilidade da existência de outros patógenos presentes nas amostras, podendo ocorrer competitividade e dificultar o isolamento de *Mycoplasma* spp., considerando-se o tempo mais longo, necessário para o isolamento.

7 CONCLUSÕES

Não foi possível a identificação de outras espécies de micoplasmas, de outras espécies de micoplasmas envolvidas em casos de mastite clínica bovina pelo sequenciamento genético, exceto *Mycoplasma bovis*;

Conclui-se que a utilização de diferentes *primers* para a identificação de outras espécies envolvidas pode elucidar aspectos epidemiológicos da mastite bovina por micoplasma;

A utilização do meio de cultura SP4 aumentou a possibilidade de detecção de micoplasmas a partir do diagnóstico microbiológico, sendo assim, conclui-se sobre a importância da sua utilização para detecção de micoplasmas viáveis em amostras de leite de casos de mastite;

A PCR permite a detecção de micoplasmas em um período de tempo menor que o cultivo microbiológico, havendo a necessidade de utilização de *primers* específicos para essa finalidade;

Para o controle da mastite por micoplasmas o diagnóstico molecular garante êxito na segregação de animais positivos, procedimento recomendado para o controle desse micro-organismo no rebanho, como medida de biossegurança.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, M.; BODMER, M.; FREY, J.; PILO, P. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Vet Microbiol.*, v.157, n.3, p.363-368, 2012.

AL-FARHA, A. A.; HEMMATZADEH, F.; KHAZANDI, M.; HOARE, A.; PETROVSKI, K. Evaluation of effects of *Mycoplasma* mastitis on milk composition in dairy cattle from South Australia. *BMC Vet Res.*, v.13, n.1, p.351, 2017.

ANGEN, O.; THOMSEN, J.; LARSEN, L.E.; LARSEN, J.; KOKOTOVIC, B.; HEEGAARD, P. M.; ENEMARK, J. M. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol.*, v.137, n.1-2, p.165-71, 2009.

AYLING, R. D.; BAKER, S. E.; PEEK, M. L.; SIMON, A. J.; NICHOLAS, R. A. J. Comparison of *in vitro* activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet Rec.*, v.146, n.9, p.745-747, 2000.

BAIRD, S. C.; CARMAN, J.; PAGE DINSMORE, R.; WLAKER, R. L.; COLLINS, J. K. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.*, v.11, n.5, p.432-435, 1999.

BARBERIO, A.; FLAMINIO, B.; DE VliegHER, S.; SUPRÉ, K.; KROMKER, V.; GARBARINO, C.; ARRIGONI, N.; ZANARDI, Z.; BERTOCCHI, L.; GOBBO, F.; CATANIA, S.; MORONI, P. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates identified in milk from dairy cattle in Belgium, Germany, and Italy. *J Dairy Sci.*, v.99, n.8, p.6578-6584, 2016.

BASHIRUDDIN, J. B.; FREY, J.; KÖNIGSSON, M. H.; JOHANSSON, K. E.; HOTZEL, H.; DILLER, R.; SANTIS, P.; BOTELHO, A.; AYLING, R. D.;

NICHOLAS, R. A. J.; THIAUCOURT, F.; SACHSE, K. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. *Vet. J.*, v.169, n.2, p.268-275, 2005.

BEHERA, S.; RANA, R.; GUPTA, P. K.; KUMAR, D.; SONAL; REKHA, V.; ARUN, T. R.; JENA, D. Development of real-time PCR assay for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Trop Anim Health Prod.*, v.50, n.4, p.875-882, 2018.

BEHRENS, A.; HELLER, M.; KIRCHHOFF, H.; YOGEV, D.; ROSENGARTEN, R. A family of phase-and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infect Immun.*, v.62, n.11, p.5075-5084, 1994.

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

BROWN, D. R.; MAY, M.; BRADBURY, J. M.; BALISH, M. F.; CALCUTT, M. J.; GLASS, J. I.; TASKER, S.; MESSICK, J. B.; JOHANSSON, K-E.; NEIMARK, H. Genus I. *Mycoplasma*, p. 575-613. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2nd ed., v.4 Springer Science + Business Media, New York, NY. 2011.

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. *J Vet Diagn Invest.*, v.17, n.6, p.537-545, 2005.

CATANIA, S.; GOBBO, F.; SCHIAVON, E.; NICHOLAS, R. A. Severe otitis and pneumonia in adult cattle with mixed infection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Record Case Reports*, v. 4, n. 2, p. e000366, 2016.

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

CLOTHIER, K. A.; JORDAN, D. M.; THOMPSON, C. J.; KINYON, J. M.; FRANA, T. S.; STRAIT, E. L. *Mycoplasma bovis* real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance. *J Vet Diag Invest.*, v.22, n.6, p.956-960, 2010.

CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Humans Mycoplasmas; Approved Guidelines. CLSI document M43-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.

CORDOVA, C. M. M.; CUNHA, R. A. F. Detecção de *Mycoplasma genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans* em pacientes com sintomas de uretrite e em indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil. *J. Brás. Patol. Med. Lab*, v. 38, n. 2, p. 119-126, 2002.

DAMASSA, AL J.; WAKENELL, P. S.; BROOKS, D. L. Mycoplasmas of goats and sheep. *J Vet Diagn Invest.*, v. 4, n. 1, p. 101-113, 1992.

DIBBERN, A. G.; BOTARO, B. G.; VIZIACK, M. P.; SILVA, L. F. P.; SANTOS, M. V. Evaluation of methods of DNA extraction from *Staphylococcus aureus* in milk for use in real-time PCR. *Genet Mol Res.*, v.14, n.1, p.227-233, 2015.

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

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, v. 39, n. 2, p. 75-90, 2002.

FADIEL, A.; EICHENBAUM, K. D.; EL SEMARY, N.; EPPERSON, B. Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution. *Front Biosci.*, v.12, p.2020-2028, 2007.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, v.39, n.4, p.729-735, 1995.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. v.39, p.783-791, 1985.

FÉRANDON, C.; PEUCHANT, O.; JANIS, C.; BENARD, A.; RENAUDIN, H.; PEREYRE, S.; BÉBÉAR, C. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. *Clin Microbiol Infect.*, v.17 n.2, p.155-159, 2011.

FREY, J. Mycoplasmas of animals. In: *Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas* (pp. 73-90). Springer, Boston, MA, 2002.

FREY, J.; SUBRAMANIAM, S.; BERGONIER, D.; NICOLET, J. DNA repair genes *uvrC* as genetic targets for discrimination of closely related mycoplasmas. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, v.3, p.40-43., 1999.

GIOIA, G.; WERNER, B.; NYDAM, D. V.; MORONI, P. Validation of a mycoplasma molecular diagnostic test and distribution of mycoplasma species in bovine milk among New York State dairy farms. *J Dairy Sci.*, v.99, n.6, p.4668-4677, 2016.

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. *Vet Microbiol.*, v.47, n.1-2, p.183-190, 1995.

GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, v.19, n.1, p. 199-221, 2003.

HAAPALA, V.; POHJANVIRTA, T.; VÄHÄNIKKILÄ, N.; HALKILAHTI, J.; SIMONEN, H.; PELKONEN, S.; SOVERI, T.; SIMOJOKI, H.; AUTIO, T. Semen as a source of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy herds. *Vet Microbiol.*, v.216, p.60-66, 2018.

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

HANNAN, P. C. T. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *Mycoplasma* species. *Vet Res.*, v. 31, n. 4, p.373-395, 2000.

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

JAO, R. L. Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to 21 antibiotics *in vitro*. *Am J Med Sci.*, v.253, n.6, p.639-650, 1967.

JUNQUEIRA, N. B.; OLIVEIRA, G. C.; SALINA, A.; GUIMARAES, F. F.; JOAQUIM, S. F.; LATOSINSKI, G. S; LANGONI, H. Mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in Brazil. In: XVIII ISAH Congress 2017, 2017, Mazatlan. Proceedings of the XVIII International Congress of the International Society for Animal Hygiene "International Co-operation and Solidarity in Animal Hygiene towards One Health", 2017.

JUNQUEIRA, N. B.; LANGONI, H. Aspectos gerais sobre a mastite bovina causada por *Mycoplasma* spp. *Vet e Zootec.*, v.23, n.3, 356-364, 2016.

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

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KÖNIGSSON, M. H.; BÖLSKE, G.; JOHANSSON, K. E. Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. *Vet. Microbiol.*, v. 85, n. 3, p. 209-220, 2002.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.*, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesq Vet Bras.*, v.33, n.5, p.620-626, 2013.

LAI, W. C.; PAKES, S. P.; STEFANU, C.; LU, Y. S. Comparison of Chalquest and Hayflick media, with and without ammonium reineckate, for isolating *Mycoplasma pulmonis* from rats. *J Clin Microbiol.*, v.23, n.5, p.817-821, 1986.

LYSNYANSKY, I.; AYLING, R. D. *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility. *Front Microbiol.*, v.7, 595, 2016.

MACHIN, D.; CAMPBELL, M.; FAYERS, P.; PINOL, A. Sample size tables for clinical studies. 2nd ed. Wiley-Blackwell Science, Oxford, UK.

MADANAT, A.; ZENDULKOVA, D.; POSPÍŠIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet Brno*, v.70, n.4, p.403-412, 2001.

MANXATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Large-scale isolation of plasmid DNA. *Molecular cloning: a laboratory manual*, p.86-96, 1982.

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

METTIFOGO, E.; 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.

MWIRIGI, M.; NKANDO, I.; AYE, R.; SOI, R.; OCHANDA, H.; BERBEROVE, E.; POTTERE, A.; GERDTS, V.; EREZ-CASAL, J.; NAESSENS, J.; WESONGA, H. Experimental evaluation of inactivated and live attenuated vaccines against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Vet Immunol Immunopathol.* v.169, p:63-67, 2016.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; STIPKOVITS, L. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*. *Vaccine*, v.20, n.29-30, p.3569-3575, 2002.

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

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

NIKFARJAM, L.; FARZANEH, P. Prevention and Detection of *Mycoplasma* Contamination in Cell Culture. *Cell J. (Yakhteh)*., v.13, n.4, p. 203-212, 2012.

NOCARD, E.; ROUX, E. R. Le microbe de La pleuropneumoniae. *Ann. Inst. Pasteur*, v.12, p. 240-262, 1898.

OLIVEIRA, T. M. S. PCR em tempo real: métodos e aplicações. 2010. 111p. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro.

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

PARKER, A. M.; SHEEHY, P. A.; HAZELTON, M. S.; BOSWARD, K. L.; HOUSE, J. K. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J Vet Intern Med.*, p.1-12, 2018.

PFÜTZNER, H.; SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.*, v.15, n.4, p.1477-1494, 1996.

PILO, P.; FREY, J.; VILEI, E. M. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J.*, v. 174, n. 3, p. 513-521, 2007.

POTHMANN, H.; SPERGSER, J.; ELMER, J.; PRUNNER, I.; IWERSEN, M.; KLEIN-JÖBSTL, D.; DRILLICH, M. Severe *Mycoplasma bovis* outbreak in an Austrian dairy herd. *J Vet Diagn Invest.*, v.27, n.6, p.777-783, 2015.

POWELL, H. A.; GOODING, C. M.; GARRETT, S. D.; LUND, B. M.; MCKEE, R. A. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.*, v. 18, n. 1, p. 59-61, 1994.

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. *Pesq Vet Bras.*, v.21, n.4, p.143-145, 2001.

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

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; PAUL ROSS, R.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *J Appl Microbiol.*, v.113, n.1, p.96-105, 2012.

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

RIEKERINK, R. G. O.; BARKEMA, H. W.; VEENSTRA, S.; POOLE, D. E.; DINGWELL, R. T.; KEEFE, G. P. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can Vet J.*, v.47, n.6, p.567-572, 2006.

ROBERTSON, J.A.; TAYLOR-ROBINSON, D. Genus I. Ureaplasma. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 2nd ed., v.4 Springer Science + Business Media, New York, NY.

ROSSETTI, B. C.; FREY, J.; PILO, P. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. *Mol Cell Probes*, v.24, n.5, p.321-323, 2010.

ROY, E. A. New Zealand to cull more than 100,000 cows to eradicate *Mycoplasma* disease. *The Guardian*, International Edition. 2018. Disponível em:

<<https://www.theguardian.com/world/2018/may/28/new-zealand-cull-cow-mycoplasma-disease>>. Acesso em 12 de junho de 2018.

SACHSE, K.; SALAM, H. S.; DILLER, R.; SCHUBERT, E.; HOFFMANN, B.; HOTZEL, H. Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet J*, v.186, n.3, p.299-303, 2010.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SOSA C., TIRANTE L., CHAVES J., POL M., AMBROGI A., GIRAUDOA J.A., TAMIOZZO P. Identificación de especies de *Mycoplasma* y de *Ureaplasma diversum* en rodeos lecheros de Argentina. *Rev Argent Microbiol.*, v.50, n.1, p.31-35, 2017.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.*, v.113, n.5, p:1014-1026, 2012.

TAMIOZZO, P. J.; ESTANGUET, A. A.; MAITO, J.; TIRANTE, L.; POL, M.; GIRAUDO, J. A. Detección de *Mycoplasma canadense* y *Mycoplasma californicum* en ganado lechero de Argentina. *Rev Argent Microbiol.*, v. 46, n. 2, p. 119-121, 2014.

TEMPLETON, K. E.; SCHELTINGA, S. A.; GRAFFELMAN, A. W.; VAN SCHIE, J. M.; CRIELAARD, J W.; SILLEKENS, P.; VAN DEN BROEK, P. J.; GOOSSENS, H.; BEERSMA, M. F. C.; CLAAS, E. C. J. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.*, v. 41, n. 9, p. 4366-4371, 2003.

THOMAS, A.; DIZIER, I.; LINDEN, A.; MAINIL, J.; FREY, J.; VILEI, E. Conservation of the *uvrC* gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis. *Vet J.*, v. 168, n. 1, p. 100-102, 2004.

TORTORELLI, G.; CARRILLO GAETA, N.; MENDONÇA RIBEIRO, B. L.; MIRANDA MARQUES, L.; TIMENETSKY, J.; GREGORY, L. Evaluation of Mollicutes microorganisms in respiratory disease of cattle and their relationship to clinical signs. *J Vet Intern Med.*, v.31, n.4, p.1215-1220, 2017.

TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mollicutes. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology: molecular characterization, v. 1, p. 33, 1995.

USDA - United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. Dairy: World Market and Trends. Disponível em <<https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=https://apps.fas.usda.gov/PSDOnline/Circulars/2018/09/Dairy.pdf>> Acesso em 18 out. 2018.

USMAN, T.; YU, Y.; LIU, C.; FAN, Z.; WANG, Y. Comparison of methods for high quantity and quality genomic DNA extraction from raw cow milk. *Genet Mol Res.*, v.13, n.2, p.3319-3328, 2014.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.*, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN DER LOGT, J. T. M.; 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, n.8, p.2606-2615, 1992.

VOLK, H.; PISKERNIK, S.; – KURINČIČ, M.; KLANČNIK, A.; TOPLAK, N.; JERŠEK, B. Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *J Food Nutr Res.*, v. 53, n. 2, p. 97-104, 2014.

WHITFORD, H. W.; ROSEBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis. Ames: Iowa State University, 1994. 150 p.

WHITHEAR, K. G.; BOWTELL, D. D.; GHIOCAS, E.; HUGHES, K. L. Evaluation and use of a Micro-Broth Dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics. *Avian Dis.*, v.27, n.4, 937-949, 1983.

WINCHELL, J. M.; THURMAN, K. A.; MITCHELL S. L.; THACKER W. L.; FIELDS, B. S. Evaluation of Three Real-Time PCR Assays for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an Outbreak Investigation. *J. Clin. Microbiol.*, v.46, n.9, p.3116-3118, 2008.

XIN, J.; LI, Y.; NICHOLAS, R. A. J.; CHEN, C.; LIU, Y.; ZHANG, M.; DONG, H. A history of the prevalence and control of contagious bovine pleuropneumonia in China. *Vet J.*, v.191, n.2, 166-170, 2012.

TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo redigido de acordo com as normas do periódico científico “Pesquisa Veterinária Brasileira”

Detecção microbiológica e molecular de *Mycoplasma bovis* em amostras de leite oriundas de mastite clínica bovina¹

Anelise Salina ², Jorge Timenetsky ³, Maysa S. Barbosa ³, Cristiane M. Azevedo ⁴, Helio Langoni ^{2*}

ABSTRACT.- Salina A., Timenetsky J., Barbosa M. S., Azevedo C. M., Langoni H. [**Microbiological and molecular detection of *Mycoplasma bovis* in milk samples from bovine clinical mastitis**]. Detecção microbiológica e molecular de *Mycoplasma bovis* em amostras de leite oriundas de mastite clínica bovina. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rua Doutor Walter Maurício Correa, s/n, Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, SP, 18618-681, Brazil. E-mail: hlangoni@fmvz.unesp.br

The *Mycoplasma* genus includes more than 200 species responsible for causing diseases in animals. It presents cells of reduced size and in variable shapes. It can cause bovine mastitis and may also be related to other manifestations such as arthritis and pneumonia in calves and heifers. The present study aimed at the detection of *Mycoplasma bovis* isolates from clinical bovine mastitis milk samples, as well as the comparison of the isolation rate in two culture media: Hayflick and SP4. In order to do so, 1166 milk samples were evaluated by conventional PCR technique from dairy farms from the ABCW - Paraná dairy region and from a property located in the region of São Pedro - São Paulo. From this total, in 100 milk samples that were PCR positive for the Mollicutes class, PCR was performed for the detection of *Mycoplasma bovis*, obtaining 13% positivity (13/100). Real-time PCR analysis yielded 11% (11/100) of positive samples for *Mycoplasma bovis*. In the microbiological culture, 6% (6/100) of growth was obtained by using the Hayflick medium and 11% (11/100) growth when using the SP4 medium (including the positive ones). From these isolates in PPLO broth, nine of them were positive to conventional PCR for *Mycoplasma bovis* and two, negative. In the phylogenetic analysis of the isolates, from the results of the sequencing, 100% of *Mycoplasma bovis* was obtained for all the isolates. In view of the results obtained, it is emphasized that the importance of further studies for the elucidation of other species of mycoplasmas involved in bovine mastitis, and reinforces the participation of *Mycoplasma bovis* in their etiology.

INDEX TERMS: Mycoplasmosis, PCR, bovine mastitis, Mollicutes, milk.

RESUMO.- O gênero *Mycoplasma* inclui mais de 200 espécies responsáveis por causar doenças nos animais. Apresenta células de tamanho reduzido e em formatos variáveis. É responsável por quadros de mastite em bovinos, podendo também, estar relacionado a outras manifestações como artrite e pneumonia em bezerras e novilhas. O presente estudo objetivou a detecção de *M. bovis* isolados a partir de amostras de leite de mastite clínica bovina, bem como, a comparação da taxa de isolamento em dois meios de cultura: Hayflick e SP4. Para tanto, foram avaliadas 1166 amostras de leite casos de mastite clínica pela técnica de PCR convencional, provenientes de propriedades leiteiras da região da bacia leiteira ABCW - Paraná e de uma propriedade situada na região de São Pedro - São Paulo. Desse total, em 100 amostras de leite que foram positivas à PCR para a classe Mollicutes, realizou-se a PCR para detecção de *M. bovis* obtendo-se positividade de 13% (13/100). Na análise pela PCR em tempo real obteve-se 11% (11/100) de amostras positivas para *M. bovis*. No cultivo microbiológico, obteve-se 6% (6/100) de crescimento ao se utilizar o meio Hayflick e, 11% (11/100) de crescimento ao se utilizar o meio SP4 (incluindo as positivas ao primeiro). A partir desses isolados em caldo PPLO, nove deles foram positivos à PCR convencional para *M. bovis* e dois, negativos. Na análise filogenética dos isolados, a partir dos resultados do sequenciamento, obteve-se 100% de *M. bovis* para todos os isolados. Frente aos resultados obtidos, ressalta-se a importância

de estudos mais aprofundados para a elucidação de outras espécies de micoplasmas envolvidas na mastite bovina, e reforça a participação de *M. bovis* na sua etiologia.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Micoplasmose, PCR, mastite bovina, Mollicutes, leite.

INTRODUÇÃO

Mycoplasma bovis é um dos agentes mais importantes relacionados à surtos de mastite clínica em grandes rebanhos leiteiros. Responsável por ocasionar problemas respiratórios, surtos de mastite clínica e acentuada queda na produção de leite, principalmente em grandes rebanhos (Aebi et al 2012). Por outro lado, em rebanhos com menor número de animais, as manifestações decorrentes da presença de *M. bovis*, ocorrem principalmente na forma de artrite e pneumonia em bezerras e novilhas (Pfützner & Sachse 1996).

Mais de 25 espécies pertencentes à classe Mollicutes causam mastite e outras manifestações clínicas em vacas e novilhas, sendo mais frequentes em rebanhos leiteiros: *M. californicum*, *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovirhinis*, *M. bovis genitalium*, *M. canadense*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* (Higuchi et al 2013) e *M. bovis* (Aebi et al 2012, Nicholas et al 2016, Al-Farha et al 2017). No Brasil, o primeiro relato da doença em rebanho leiteiro foi de Mettifogo et al. (1996). Até o momento, no Brasil, poucos estudos têm sido realizados a fim de se elucidar a ocorrência da micoplasmose mamária. Junqueira et al (2017), reportaram a ocorrência de 3% de *M. bovis* em amostras de mastite clínica bovina. Manzi et al (2018) em estudo da ocorrência de *M. bovis* em tanques de expansão, obtiveram 1,4% para a mesma espécie.

A identificação de micoplasmas no leite se dá por meio de cultivo microbiológico, considerado padrão ouro para detecção de infecções por este agente. De maneira geral, a técnica é simples, porém, são necessários meios de cultura com enriquecimento específico para as diferentes espécies envolvidas na etiologia das mastites, tornando o diagnóstico trabalhoso. Como exemplo, pode-se citar *M. arginini* que necessita da adição de arginina no meio de cultura para o seu crescimento (Brown et al 2011).

Técnicas moleculares são muito utilizadas na identificação de espécies de micoplasmas envolvidas nas mastites (Baird et al 1999, Aebi et al 2012, Higuchi et al 2013). Dentre elas, a PCR é a técnica mais utilizada em pesquisas moleculares, pois permite um resultado rápido, quando comparado ao cultivo microbiológico, e a possibilidade da identificação de diferentes espécies.

Considerando-se a importância das mastites, seu impacto negativo na cadeia produtiva do leite e a prevalência de mastites por *M. bovis* relatada na literatura internacional, propusemos o presente estudo a fim de detectar esse patógeno e comparar a detecção do mesmo em dois meios de cultura, Hayflick e SP4.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Foram avaliadas 1166 amostras de leite de mastite clínica bovina, provenientes de nove propriedades leiteiras da região da bacia leiteira ABCW – Paraná e de uma propriedade situada na região de São Pedro – São Paulo, identificadas de ‘A’ a ‘J’. As propriedades são altamente tecnificadas para a produção de leite bovino e apresentam apenas esse tipo de produção. As amostras de leite avaliadas foram enviadas ao NUPEMAS (Núcleo de Pesquisa em Mastites, UNESP, Botucatu) para o diagnóstico de *Mycoplasma* spp. nos rebanhos, consideradas portanto, amostras de conveniência.

Extração do DNA. Após o recebimento das amostras de leite, alíquotas de 1 mL foram mantidas em microtubos livre de DNase e RNase, para a extração do DNA bacteriano. Para efeito de triagem amostral, a extração do DNA foi procedida seguindo o método de termólise descrito por Fan et al (1995). Uma etapa adicional de purificação do DNA foi realizada posteriormente, com adição de acetato de sódio e etanol.

PCR convencional para Mollicutes e *M. bovis*. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®). A reação foi preparada conforme segue: 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 1 µL de cada *primer*, 7,5 µL de água ultra-pura (Gibco®) e 3 µL de DNA extraído, para um volume final de 25 µL. Inicialmente realizou-se amplificação do DNA da classe Mollicutes, e uma vez positivas, foi realizada a amplificação do DNA de *M. bovis* com o uso dos *primers* específicos relacionados na Tabela 1. 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-Aldrich®). O gel foi visualizado em transluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital.

PCR em tempo real para detecção de *M. bovis*. Taqman® PCR em tempo real foi realizada em equipamento Applied Biosystems Step One™ (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). A reação de PCR em tempo real foi preparada conforme segue: 12,5 µL TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10 µM de cada *primer*, 10 µM de sonda TaqMan®, 20 ng ou 1 µL de DNA extraído, água destilada ultra-pura (Gibco®) para um volume final de 25 µL. Os *primers* amplificam um fragmento de gene *uvrC* com um produto de 112 pares de base e mostram especificidade para *M. bovis* usando GenBank (Clothier et al 2010) e estão descritos na Tabela 1. Para a determinação da sensibilidade da reação de PCR, foram realizadas diluições seriadas da cultura pura de *M. bovis* Donetta. Todas as reações foram realizadas em duplicata, em placas de 96 poços, seladas com filme de vedação ótica.

Isolamento em Hayflick modificado e SP4. Para isolamento de espécies de micoplasmas, foi realizado cultivo de 10µL de cada amostra de leite positiva à PCR, em meio sólido Hayflick suplementado, conforme descrito por Whitford (1994) e acrescido de acetato de tálio a 0,01% (González & Wilson 2003), bem como em meio SP4, de acordo com Tully (1995). A incubação foi procedida em ambiente de microaerofilia a 5%, em estufa de CO₂, com observação do isolamento microbiano 3, 5, 7 e 10 dias após incubação. O acompanhamento do crescimento microbiano foi realizado em lupa estereoscópica (Modelo ZEISS SteREO Discovery.V8), em aumento de 3x, considerando-se positivas aquelas com presença de colônias de aspecto característico de “ovo-frito” (Pretto et al 2001). Uma vez positivas, retirou-se uma colônia, juntamente com o meio de cultura e a mesma foi inoculada em caldo PPLO (*pleuropneumonia like organisms*) acrescido de arginina 1%, para promoção de crescimento. Em seguida realizou-se a PCR dos isolados para identificação de *M. bovis*.

Sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados. As sequências *sense* e *antisense* obtidas na forma de eletroferograma foram visualizadas no software Chromas versão 2.6.5 (Technelysium Pty Ltd 1998-2018©), e checadas manualmente para remoção das extremidades e identificação de erros ou discrepâncias. A seguir, as sequências foram submetidas ao BLASTn (*nucleotide basic local alignment search tool*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), a fim de confirmar a identidade dos produtos obtidos na PCR. Em seguida, foram submetidas ao alinhamento múltiplo pelo método ClustalW no programa MEGA X (Kumar et al 2018), juntamente com outras 13 sequências de oito diferentes espécies de micoplasmas, incluindo espécies cujo isolamento a partir de leite bovino é relatado em literatura (Gioia et al 2016). Também foi incluída a sequência da cepa de *M. bovis* utilizada como controle positivo nos ensaios de PCR.

A reconstrução filogenética também foi realizada no programa MEGA X pelo método Maximum Likelihood, utilizando-se o modelo de substituição Kimura 2-parameter, assumindo-se que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis ([+I], 66,24%) (Kimura 1980). Este modelo de substituição foi definido como o mais apropriado ao banco de dados, determinado pelo procedimento de seleção de modelo no MEGA X, sendo selecionado aquele com menor *score* sob o critério de informação Bayesiano (BIC – Bayesian information criterion). A árvore *consenso* foi inferida a partir de 1000 replicatas de Bootstrap (Felsenstein 1985). As árvores iniciais para a busca heurística foram obtidas automaticamente, aplicando-se algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ em uma matriz de distâncias entre pares estimadas usando a abordagem Maximum Composite Likelihood (MCL), selecionando-se, então, a topologia com valor superior de log likelihood.

RESULTADOS

Análises moleculares

Das 1166 amostras de leite de casos de mastite clínica analisadas, 8,6% (100/1166) foram positivas na detecção molecular para a classe Mollicutes. Ao se pesquisar a presença de *M. bovis* nas 100 amostras positivas para Mollicutes, obteve-se 13% (13/100) de positividade à PCR convencional enquanto à PCR em tempo real, obteve-se 11% (11/100). A positividade em pelo menos uma das análises moleculares foi de 16%, em cinco das dez propriedades avaliadas. Três amostras foram negativas à PCR convencional, entretanto, positivas na PCR em tempo real. Oito amostras foram positivas em ambos os testes moleculares. Cinco amostras foram negativas à PCR em tempo real e positivas à PCR convencional (Tabela 2).

Ainda pela análise da Tabela 2, tem-se que as propriedades classificadas como E, G, H, I e J não revelaram amostras positivas na pesquisa de *M. bovis*, assim sendo, não foram incluídas na tabela. Considerando-se que foram utilizadas amostras de conveniência de um total de dez propriedades,

com pelo menos uma amostra de leite positiva para o agente, tem-se que 50% (5/10 – A, B, C, D e F) das propriedades foram positivas na pesquisa de *M. bovis* quando avaliadas pelas técnicas moleculares.

Análise do sequenciamento

A partir do produto amplificado dos isolados e sequenciamento, 100% dos isolados foram agrupados com similaridade para *M. bovis*, confirmando os resultados obtidos na PCR, excetuando duas amostras que não amplificaram à PCR para o agente. Os dois isolados que foram negativos à PCR convencional para *M. bovis*, também foram agrupados com similaridade ao agente na análise filogenética dos isolados.

Análise microbiológica

Todas as amostras de leite positivas à PCR para a classe Mollicutes foram cultivadas em meio Hayflick modificado e em meio SP4 suplementado. Obteve-se 6% (6/100) de isolamento para o gênero *Mycoplasma* ao Hayflick e 11% (11/100) ao SP4, sendo que, todas as amostras positivas ao Hayflick também foram positivas ao SP4. O meio de cultura SP4 se mostrou 18,8 vezes superior para o isolamento do gênero *Mycoplasma* ($P=0,0253$), quando comparada à chance de isolamento de *Mycoplasma* no meio Hayflick (IC 95% = 8,01 - 44,05).

Uma amostra foi negativa em ambos os testes para detecção de *M. bovis* nos testes moleculares a partir da amostra clínica do leite, e positiva no cultivo microbiológico. O isolado obtido após o cultivo foi detectado como positivo para *M. bovis* na técnica da PCR convencional. Três amostras analisadas foram positivas para todos os testes realizados: PCR convencional e tempo real; cultivo em meio de Hayflick e SP4.

DISCUSSÃO

A pesquisa de *M. bovis* em amostras de leite bovino é amplamente realizada devido à maior prevalência e importância desse patógeno na etiologia das mastites, reportada em estudos anteriores (Aebi et al 2012, Higuchi et al 2013, Gioia et al 2016). A detecção de 16% desta espécie no presente estudo é inferior à reportada por outros autores (Higuchi et al 2013, Lysnyansky et al 2016)

Até o momento, não há estudos que se refiram à etiologia da micoplasmose mamária no Brasil, o que dificulta a comparação da ocorrência das espécies mais prevalentes no país. A literatura disponibiliza dados relacionados à ocorrência de *M. bovis* nos rebanhos leiteiros. Em tanques de expansão de leite, Manzi et al (2018) obtiveram 1,4% de prevalência de *M. bovis*, em 67 amostras de tanques analisadas. Junqueira et al (2017) analisaram amostras de leite de mastite clínica, e reportam a ocorrência de 3% de *M. bovis* à PCR convencional.

Por outro lado, em outros países, a ocorrência de outras espécies de micoplasmas é muito estudada. Em estudo realizado no Japão, Higuchi et al (2013) obtiveram 89% (184/208) de quartos mamários infectados com apenas uma espécie de micoplasma, sendo: *M. bovis* a mais prevalente, *M. alkalescense*, *M. californicum*, *M. arginini*, *M. canadense*, *M. bovigenitalium* e *M. adleri*. O restante dos quartos apresentaram coinfeção com mais de uma espécie de micoplasma.

No estado de Nova Iorque, nos EUA, a prevalência de *M. bovis* é reportada como a maior dentre outras espécies de micoplasmas. Gioia et al (2016) descrevem a ocorrência das seguintes espécies da classe Mollicutes, causando mastite: 78% de *M. bovis*, 17% de *M. alkalescens*, 11% de *Acholeplasma laidlawii*, 10% de *M. bovigenitalium*, 10% de *M. canadense*, 3% de *M. californicum*, 2% de *M. arginini*, 2% de *Acholeplasma oculi* e 1% de *M. bovirhinis*.

A PCR é uma ferramenta molecular muito utilizada em pesquisas envolvendo uma variedade de amostras, incluindo as de leite. A presença de inibidores da *Taq* polimerase na amostra pode desencadear reações falso-negativas, podendo ser de origem da própria amostra ou introduzidos durante alguma etapa da reação. Amostras de leite possuem naturalmente cálcio e gordura em sua composição, que podem inibir a PCR dependendo das concentrações presentes (Schrader et al 2012). Powell et al (1994) encontraram no leite um inibidor natural da *Taq* polimerase, a plasmina, componente capaz de inibir a reação de PCR.

Sugere-se a presença de algum inibidor da PCR presente no leite de uma amostra avaliada. A referida amostra clínica foi positiva na detecção de Mollicutes e negativa nas duas técnicas moleculares para detecção de *M. bovis*, entretanto, foi positiva no cultivo microbiológico para aquela espécie. Tal fato sugere um resultado falso-negativo para *M. bovis* a partir da análise do leite. A possibilidade de baixa concentração do DNA de *M. bovis* na amostra clínica pode ser a causa desse achado.

A PCR em tempo real amplifica regiões específicas do genoma bacteriano a partir de quantidades mínimas de DNA (Valasek & Repa 2005), sendo mais sensível do que a PCR convencional. Porém, essa sensibilidade depende diretamente da qualidade do DNA genômico. Templeton et al (2003) compararam técnicas de diagnóstico para a detecção de *M. pneumoniae* e concluíram que a PCR em tempo real é mais sensível, específica e claramente superior à PCR convencional na detecção do patógeno em amostras oriundas de pacientes adultos com infecção do trato respiratório inferior.

O método de extração por termólise é uma opção simples e não onerosa, mas resulta em um DNA de qualidade inferior aos de kits comerciais, com presença de proteínas ou outros inibidores da PCR. No entanto, é uma técnica totalmente exequível para diagnóstico de *Mycoplasma* no leite, com bons resultados obtidos e já padronizados no nosso laboratório. Optou-se por realizar a extração por esse método, seguida de protocolo de purificação do DNA para obtenção de um material analítico de melhor qualidade, considerando-se os custos e praticidade do método. Para a realização da PCR convencional, é possível a utilização da extração por termólise com resultados satisfatórios na detecção de *M. canadense* e *M. californicum* a partir de isolados de amostras de leite (Tamiozzo et al 2014).

No presente estudo não foi avaliada a eficiência do DNA, e não foram comparados os protocolos de extração por termólise com outros protocolos, sendo assim não se pode afirmar se houveram resultados falso-negativos resultantes da baixa qualidade do DNA, considerando o protocolo de extração de DNA utilizado.

A dificuldade em se identificar as espécies *M. agalactiae* e *M. bovis* a partir da sequência de seus 16s rRNA é difícil devido à elevada similaridade encontrada entre os 16s RNA dessas espécies (Königsson et al 2002, Bashiruddin et al 2005). Entre os isolados obtidos no presente estudo, duas amostras não amplificaram à PCR convencional para *M. bovis*, porém, amplificaram a partir da amostra clínica do leite para o mesmo agente. Na análise do sequenciamento, as duas amostras agruparam no *cluster* para *M. bovis* e *M. agalactiae*, devido à elevada similaridade entre elas. Frente aos resultados moleculares obtidos anteriormente, a partir das amostras clínicas, sugere-se que são *M. bovis*, mesmo sem a amplificação do isolado.

A epidemiologia da ocorrência das duas espécies, *M. bovis* e *M. agalactiae* nos animais, são distintas. A primeira ocorre em bovinos, causando principalmente mastite, pneumonia e artrite (Pfützner & Sachse 1996) e a segunda, em pequenos ruminantes, responsável pela agalaxia contagiosa (González et al 1995). Há relatos sobre a ocorrência de *M. agalactiae* em touros, com acometimento ocular, cerebral e no conduto auditivo (Catania et al 2016) porém em quadros de mastite, não há relatos até o momento.

A ocorrência de *M. bovis* em pequenos ruminantes é incomum, embora possa ocasionalmente ser isolado dos pulmões de caprinos. Um fator de risco associado à presença de *M. bovis* em caprinos é o fornecimento de leite bovino a cabritos jovens como suplementação alimentar, podendo este micro-organismo colonizar a cavidade oral, orofaringe, traqueia e pulmões (DaMassa et al 1992). As propriedades avaliadas no presente estudo são altamente tecnificadas para a produção de leite bovino e não dispõe de criação de caprinos ou ovinos, sendo, portanto pouco provável a ocorrência de mastite bovina por *M. agalactiae*.

Sabe-se da dificuldade no isolamento de *Mycoplasma* em meios de cultura devido às características relacionadas às diferentes espécies. Para aumentar a possibilidade da detecção de outras espécies, utilizaram-se no presente estudo dois meios de cultura, mas não houve crescimento de espécies diferentes de *M. bovis*.

O meio de Hayflick modificado é recomendado para o isolamento de *M. bovis* em amostras de leite (Pfützner et al 1996), e tem sido utilizado por vários autores com sucesso (Pretto et al 2001, Cai et al 2005, Riekerink et al 2006). A utilização de mais de um meio de cultura pode aumentar a taxa de isolamento de espécies de micoplasmas, como observado por Lai et al (1986) ao compararem os meios de Chalquest e Hayflick na detecção de *M. pulmonis*, com 92% e 66% de isolamento, respectivamente.

Tortorelli et al (2017) obtiveram apenas um resultado positivo no isolamento em meio de Hayflick em 32 secreções provenientes de doença respiratória bovina, salientando um baixo percentual de isolamento quando comparado à outros estudos. Os autores observaram também que frequentemente o resultado do isolamento bacteriano não está associado à positividade à PCR, com resultados de culturas negativas e moleculares positivos, fato também observado no presente estudo.

As amostras utilizadas neste estudo foram de conveniência, ou seja, encaminhadas para diagnóstico de *Mycoplasma* spp. em diferentes rebanhos. Todas as amostras foram recebidas

congeladas e foram mantidas em temperatura de congelamento por período de até um mês, para serem processadas. A baixa taxa de isolamento pode estar associada ao congelamento e descongelamento das amostras de leite, com conseqüente redução da carga microbiana viável e possibilidade de resultados falso-negativos no cultivo microbiológico.

A ocorrência de resultados negativos ao cultivo microbiológico concomitante com resultado positivo à PCR é relatada na literatura (Férandon et al 2011). A positividade no cultivo microbiológico pode variar entre os diferentes estudos. A utilização de mais de um tipo de meio de cultura pode influenciar na positividade dos resultados, pois, sabe-se que as espécies de micoplasmas apresentam diferenças quanto às exigências para o seu desenvolvimento. Férandon et al (2011) obtiveram 29,4% (45/153) de positividade no cultivo microbiológico, superior ao obtido no presente estudo, que foi de 11%, e pode estar relacionado à qualidade e viabilidade celular das amostras analisadas.

O elevado percentual de amostras negativas no cultivo pode se dar principalmente pela possibilidade de inviabilidade celular ou ao meio de cultura não ser específico para todas as espécies do agente, considerando que só se identificou *M. bovis* na PCR. Além desses aspectos, deve-se considerar a possibilidade da existência de outros patógenos presentes nas amostras, podendo ocorrer competitividade e dificultar o isolamento de *Mycoplasma* spp., considerando-se o tempo mais longo, necessário para o isolamento.

É de se esperar que os resultados da PCR superem a positividade do cultivo microbiológico, considerando que o primeiro detecta DNA degradado de micoplasmas não viáveis, ou ainda, culturas negativas podem conter uma baixa concentração de DNA não sendo detectáveis na PCR. Essa constatação foi observada no presente estudo, com 89% de amostras negativas no cultivo microbiológico.

CONCLUSÕES

Não foi possível a identificação de espécies de micoplasmas envolvidas em casos de mastite clínica bovina, pelo sequenciamento genético, exceto *Mycoplasma bovis*;

Conclui-se que a utilização de diferentes *primers* para a identificação de outras espécies envolvidas pode elucidar aspectos epidemiológicos da mastite bovina por micoplasma;

A utilização do meio de cultura SP4 aumentou a possibilidade de detecção de micoplasmas a partir do diagnóstico microbiológico, sendo assim, conclui-se sobre a importância da sua utilização para detecção de micoplasmas viáveis em amostras de leite de casos de mastite;

Para o controle da mastite por micoplasmas, o diagnóstico molecular garante êxito na segregação de animais positivos, procedimento recomendado para o controle desse micro-organismo no rebanho, como medida de biossegurança.

Agradecimentos.- À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado. À equipe liderada pelo Professor Jorge Timenetsky, pelo suporte oferecido no desenvolvimento da PCR em tempo real.

Conflito de interesse.- Os autores declaram que não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- Aebi M., Bodmer M., Frey J. & Pilo P. 2012. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Vet Microbiol.* 157(3):363-368.
- Al-Farha A.A., Hemmatzadeh F., Khazandi M., Hoare A. & Petrovski K. 2017. Evaluation of effects of *Mycoplasma* mastitis on milk composition in dairy cattle from South Australia. *BMC Vet Res.* 13(1):351.
- Baird S.C., Carman J., Page Dinsmor E.R., Wlaker R.L. & Collins J.K. 1999. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 11(5):432-435.
- Bashiruddin J.B., Frey J., Königsson M.H., Johansson K.E., Hotzel H., Diller R., Santis P., Botelho A., Ayling R.D., Nicholas R.A.J., Thiaucourt F. & Sachse K. 2005. Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. *Vet. J.* 169(2):268-275.
- Brown D.R., May M., Bradbury J.M., Balish M.F., Calcutt M.J., Glass J.I., Tasker S., Messick J.B., Johansson K.E. & Neimark H. 2010. Genus I. *Mycoplasma*. In: Krieg N.R., Staley J.T., Hedlund B., Paster B.J., Ward N., Ludwig W., & Whitman W.B., editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. second ed. Springer; New York, NY: 2010 p. 575-613.

- Cai H.Y., Bell-Rogers P., Parker L. & Prescott J.F. 2005. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *J Vet Diagn Invest.* 17(6):537-545.
- Catania S., Gobbo F., Schiavon E. & Nicholas R.A. 2016. Severe otitis and pneumonia in adult cattle with mixed infection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Record Case Reports.* 4(2):e000366.
- Clothier K.A., Jordan D.M., Thompson C.J., Kinyon J.M., Frana T.S. & Strait E.L. 2010. *Mycoplasma bovis* real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance. *J Vet Diagn Invest.* 22(6):956-960.
- DaMassa A.J., Wakenell P.S. & Brooks D.L. 1992. *Mycoplasmas* of goats and sheep. *J Vet Diagn Invest.* 4(1):101-113.
- Fan H.H., Kleven S.H. & Jackwood M.W. 1995. Application of polymerase chain reaction with arbitrary to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 39(4):729-735.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-791.
- Férandon C., Peuchant O., Janis C., Benard A., Renaudin H., Pereyre S. & Bébéar C. 2011. Development of a real-time PCR targeting the *gidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. *Clin Microbiol Infect.* 17(2):155-159.
- Gioia G., Werner B., Nydam D.V. & Moroni P. 2016. Validation of a mycoplasma molecular diagnostic test and distribution of mycoplasma species in bovine milk among New York State dairy farms. *J Dairy Sci.* 99(6):4668-4677.
- González Y.R.C., Bascuñana C.R., Bölske G., Mattsson J.G., Molina C.F. & Johansson K.E. 1995. *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet Microbiol.* 47(1-2):183-190.
- González R.N. & Wilson D.J. 2003. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 19(1):199-221.
- Higuchi H., Gondaira S., Iwano H., Hirose K., Nakajima K., Kawai K., Hagiwara K., Tamura Y. & Nagahata H. 2013. *Mycoplasma* species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. *Vet Rec.* 172(21):557.
- Junqueira N.B., Oliveira G.C., Salina A., Guimaraes F.F., Joaquim S.F., Latosinski G.S. & Langoni H. Mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in Brazil. In: XVIII ISAH Congress, 2017, Mazatlan. Proceedings of the XVIII International Congress of the International Society for Animal Hygiene "International Co-operation and Solidarity in Animal Hygiene towards One Health", 2017.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16(2):111-120.
- Königsson M.H., Bölske G. & Johansson K.E. 2002. Intraspecific variation in the 16S rRNA gene sequences of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* strains. *Vet. Microbiol.* 85(3):209-220.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 35(6):1547-1549.
- Lai W.C., Pakes S.P., Stefanu C. & Lu Y.S. 1986. Comparison of Chalquest and Hayflick media, with and without ammonium reineckate, for isolating *Mycoplasma pulmonis* from rats. *J Clin Microbiol.* 23(5):817-821.
- Lysnyansky I., Freed M., Rosales R.S., Mikula I., Khateb N., Gerchman I., Straten M. & Levisohn S. 2016. An overview of *Mycoplasma bovis* mastitis in Israel (2004–2014). *Vet J.* 207:180-183.
- Manzi M.P., Joaquim S.F., Guimarães F.F., Bruder-Nascimento A.C.M.O., Pantoja J.C.F. & Langoni H. 2018. Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. *Pesq Vet Bras.* 38(4):665-669.
- Mettifogo E., Nascimento E.R., Müller E.E., Nascimento M.G.F. & Freitas J.C. 1996. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. *Revta Bras. Med. Vet.* 18:22-25.
- Nicholas R.A.J., Fox L.K. & Lysnyansky I. 2016. Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull. *Vet J.* 216:142-147.
- Pfützner H. & Sachse K. 1996. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 15(4):1477-1494.
- Powell H.A., Gooding C.M., Garrett S.D., Lund B.M. & McKee R.A. 1994. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.* 18(1):59-61.
- Pretto L.G., Muller E.E., Freitas J.C., Mettifogo E., Buzihani M., Yamaguti M. & Salvador R. 2001. *Pesq Vet Bras.* 21(4):143-145.

- Riekerink R.G.O., Barkema H.W., Veenstra S., Poole D.E., Dingwell R.T. & Keefe G.P. 2006. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *Can Vet J.* 47(6):567-572.
- Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L. & Johne R. 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 113(5):1014-1026.
- Tamiozzo P.J., Estanguet A.A., Maito J., Tirante L., Pol M. & Giraud J.A. 2014. Detección de *Mycoplasma canadense* y *Mycoplasma californicum* en ganado lechero de Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 46(2):119-121.
- Templeton K.E., Scheltinga S.A., Graffelman A.W., Van Schie J.M., Crielaard J.W., Sillekens P., Van Den Broek P.J., Goossens H., Beersma M.F.C. & Claas E.C.J. 2003. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 41(9):4366-4371.
- Tortorelli G., Gaeta N.C., Ribeiro B.L.M., Marques L.M., Timenetsky J. & Gregory L. 2017. Evaluation of Mollicutes microorganisms in respiratory disease of cattle and their relationship to clinical signs. *J Vet Intern Med.*, 31(4):1215-1220.
- Tully J.G. 1995. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mollicutes. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, vol. 1, pp. 33-39. Edited by S. Razin & J.G. Tully. San Diego, CA: Academic Press.
- Valasek M.A. & Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 29(3):151-159.
- Van Kuppeveld F.J.M., Van Der Logt J.T.M., Angulo A.F., Van Zoest M.J., Quint W.G., Niesters H.G., Galama J.M. & Melchers W.J. 1992. Genus - and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol.* 58(8):2606-2615.
- Whitford H.W., Rosenbusch R.F. & Lauerma L.H. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames: Iowa StateUniversity, 1994. 150 p.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR convencional e em tempo real.

	Sequência	Tamanho do produto	Referência
MGSO	5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CT 3'	270pb	VAN KUPPEVELD et al (1992)
GPO-3	5' GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T 3'		
MBO _f	5' CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG 3'	360pb	GONZÁLEZ et al (1995)
MBO _r	5' CCG TCA AGG TAG CAT CAT TTC CTA T 3'		
Mbov F2024	5' TCT AAT TTT TTC ATC ATC GCT AAT GC 3'	112pb	CLOTHIER et al (2010)
Mbov R2135	5' TCA GGC CTT TGC TAC AAT GAA C 3'		
Mbov <i>uvrC</i>	FAM - AAC TGC ATC ATA TCA CAT ACT - MGB		

Tabela 2. : Resultados gerais das análises moleculares para *Mycoplasma bovis* e cultivo microbiológico de amostras de leite de casos de mastite clínica bovina.

Identificação Propriedade	PCR		PCR em Tempo		
	Convencional		Real	Hayflick	SP4
A	Negativo		Positivo	Negativo	Positivo
A	Positivo		Positivo	Negativo	Negativo
A	Positivo		Positivo	Negativo	Positivo
A	Negativo		Positivo	Positivo	Positivo
A	Positivo		Positivo	Positivo	Positivo
B	Positivo		Negativo	Negativo	Negativo
B	Positivo		Negativo	Negativo	Negativo
B	Positivo		Negativo	Negativo	Negativo
C	Positivo		Positivo	Positivo	Positivo
D	Negativo		Positivo	Positivo	Positivo
D	Positivo		Negativo	Negativo	Positivo
D	Positivo		Positivo	Positivo	Positivo
F	Positivo		Negativo	Negativo	Positivo
F	Positivo		Positivo	Negativo	Positivo
F	Positivo		Positivo	Negativo	Negativo
F	Positivo		Positivo	Negativo	Negativo
F	Negativo		Negativo	Positivo	Positivo