

ETIOLOGIA DAS MASTITES: PESQUISA DE MICRO-ORGANISMOS DA CLASSE *MOLLICUTES*

Bruna Churocof Lopes¹
Marcela de Pinho Manzi²
Helio Langoni³

RESUMO

A mastite é a principal afecção do gado destinado à produção leiteira, que onera o produtor e a indústria de laticínios. No primeiro caso pela perda quanto a produção, e no segundo pelo menor rendimento industrial dos derivados lácteos. É uma enfermidade multifatorial, de múltipla etiologia, incluindo micro-organismos como bactérias, vírus, fungos, leveduras e algas. Entre os micro-organismos bacterianos ganham destaque os estafilococos coagulase-positivos (SCP) e negativa (SCN), sendo o principal *Staphylococcus aureus* e várias espécies de SCN, todas caracterizadas como contagiosos, além de *Corynebacterium bovis*. Com elevada contagiosidade tem-se *Mycoplasma* spp., com destaque para *M. bovis* importante patógeno em outros países, entretanto, menos estudado no Brasil. O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de bactérias da classe *Mollicutes*, em amostras de leite bovino com mastite clínica, a partir de técnicas moleculares. Das 170 amostras de leite avaliadas, procedentes de quatro propriedades leiteiras de pequeno porte da região de Botucatu, não foi possível detectar a presença de *Mollicutes*.

Palavras-chave: mastite bovina, *Mollicutes*, PCR

ETIOLOGY OF MASTITIS: PARTICIPATION OF MICROORGANISMS OF THE CLASS *Mollicutes*

ABSTRACT

Mastitis is the main disease of livestock destined for dairy production, which affects the dairy producer and the dairy industry. In the first case the loss of production, and the second because of the lower industrial yield of dairy products. It is a multifactorial, multiple etiology, including microorganisms such as bacteria, viruses, fungi, yeasts and algae. *Staphylococcus aureus* and several species of SCN, all characterized as contagious, in addition to *Corynebacterium bovis*, are prominent among bacterial microorganisms (SCP) and negative (SCN) staphylococci. *Mycoplasma* spp. Is highly contagious, with *M. bovis* being an important pathogen in other countries, but less studied in Brazil. The objective of the present study was to evaluate the presence of bacteria of the class *Mollicutes* in samples of bovine milk with clinical mastitis, based on molecular techniques. Of the 170 milk samples evaluated, from four small dairy farms in the Botucatu region, it was not possible to detect the presence of *Mollicutes*.

Key words: bovine mastitis, *Mollicutes*, PCR

¹ Bolsista de IC FAPESP. Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu. Contato principal para correspondência.

² Pós Graduanda - Mestrado. Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu.

³ Professor Titular. Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu. hlangoni@fmvz.unesp.br

ETIOLOGIA DE LAS MASTITIS: PARTICIPACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA CLASE *Mollicutes*

RESUMEN

La mastitis es la principal afección del ganado destinado a la producción lechera, que pesa el productor y la industria láctea. En el primer caso por la pérdida en cuanto a la producción, y en el segundo por el menor rendimiento industrial de los derivados lácteos. Es una enfermedad multifactorial, de múltiple etiología, incluyendo microorganismos como bacterias, virus, hongos, levaduras y algas. Entre los microorganismos bacterianos se destacan los estafilococos coagulosa-positivos (SCP) y la negativa (SCN), siendo el principal *Staphylococcus aureus* y varias especies de SCN, todas caracterizadas como contagiosas, además de *Corynebacterium bovis*. Con una elevada contagiosidad se tiene *Mycoplasma* spp., Con destaque para *M. bovis* importante patógeno en otros países, sin embargo, menos estudiado en Brasil. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de bacterias de la clase *Mollicutes*, en muestras de leche bovina con mastitis clínica, a partir de técnicas moleculares. De las 170 muestras de leche evaluadas, procedentes de cuatro propiedades lecheras de pequeño porte de la región de Botucatu, no fue posible detectar la presencia de *Mollicutes*.

Palabras clave: bovina mastitis, *Mollicutes*, PCR

INTRODUÇÃO

A mastite é um dos principais obstáculos enfrentados na bovinocultura leiteira, pelos prejuízos econômicos levando a queda na produção de leite, e de sua qualidade, aumento do custo com tratamentos, e pelo descarte precoce de vacas que apresentam mastite crônica. Trata-se de um processo inflamatório da glândula mamária de origem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica e principalmente infecciosa. É uma doença complexa, e multifatorial causada por fatores, que envolvem o ambiente, diversos patógenos e também fatores relacionados ao próprio animal (1).

Além das perdas econômicas, na produção e qualidade e do leite, é importante ressaltar a importância na saúde pública, principalmente no caso de patógenos que são fatores de risco para a infecção de humanos, tanto pela sua eliminação, bem como pela produção de toxinas pelo leite (2,3).

Além das alterações físico-químicas do leite, a mastite também altera o parênquima da glândula mamária. A inflamação apresenta-se sob duas formas: clínica e subclínica. No primeiro caso é possível observar alterações da glândula mamária, como edema, aumento de temperatura local, hiperemia, sensibilidade e enrijecimento da glândula mamária (fibrose), bem como o aparecimento de grumos, pus, sangue ou qualquer outra alteração nas características do leite. A mastite clínica ocasiona perdas elevadas pelo descarte do leite, gastos com medicamentos, perda funcional de glândulas até por morte do animal. Seu diagnóstico é possível pela avaliação das características do leite, pela prova do Tamis (4).

A mastite subclínica caracteriza-se por alterações na composição do leite, pois, este tem suas características normais. Por outro lado ocorrem alterações relacionadas ao aumento no número de células somáticas e dos teores de cloro e sódio, além da diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura (5).

Entre os *Mollicutes* estão os micoplasmas que são as formas mais simples de organismos auto replicantes. Eles não têm a típica parede celular bacteriana e atacam diretamente a célula hospedeira para obter nutrientes essenciais (6). Hale et al. (7) relataram o

primeiro caso de mastite bovina por *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*, posteriormente denominado por Aska e Erno (8) de *Mycoplasma bovis*. No Brasil, a primeira citação de mastite por *Mollicutes*, especificamente *M. bovis* foi de Mettifogo et al. (9) na região de Londrina, Estado do Paraná.

A partir do cultivo microbiológico em meio de Hayflick suplementado e adicionado de acetato de tálio a 0,01% de acordo com Whitford (10), como fator seletivo (11), Junqueira (12) trabalhando com 561 amostras de leite provenientes de casos de mastite clínica oriundas de sete estados, bem como por biologia molecular pela técnica de PCR, encontram 17 (3,03%) amostras positivas para *Mollicutes* na PCR. Com a utilização de primers específicos para *Mycoplasma bovis* todas as amostras foram positivas sendo 35,2% (n=6) provenientes do estado do Pará, 29,4% (n=5) do estado de São Paulo, 17,6% (n=3) e 17,69% (n=3) dos estados de Minas Gerais e Goiás, respectivamente. Das 17 amostras, 11 delas foram positivas no exame microbiológico.

Salina et al. (13) examinaram 337 amostras de leite provenientes de tetos com mastite subclínica da região de Castro – PR, por PCR utilizando o método de fervura para extração do DNA de acordo com Fan et al. (14), obtiveram 130 (38,6%) de positividade para *Mollicutes*. Esses resultados tanto de casos de mastite clínica como subclínica afirmam a dispersão de micro-organismos da classe *Mollicutes*, incluindo-se *Mycoplasma bovis* na etiologia das mastites bovinas no país.

A mastite por micoplasmas caracteriza-se por aparecimento súbito, formação de secreção purulenta nos quartos afetados, rápida transmissão para o rebanho, redução significativa na produção de leite e resistência ao tratamento com antibióticos convencionais. Embora existam numerosas espécies desta classe, a mais frequente é *Mycoplasma bovis* (15), responsável por surtos esporádicos de alta contagiosidade (16). *M. bovis* pode ser introduzido em rebanhos livres da doença pela aquisição de animais portadores. No rebanho o micro-organismo dissemina-se durante a ordenha por aerossóis e secreções de animais com distúrbios respiratórios e genitais. As vias hematogena e linfática são responsáveis pela disseminação do agente de um órgão afetado para outro (17).

M. bovis é bem adaptado para a colonização de superfícies mucosas, onde pode persistir sem causar doença clínica. A mucosa do trato respiratório superior é o principal local de colonização do agente (17). Relatório de custos estimados nos EUA indicaram perdas de 108 milhões de dólares por ano para a indústria de laticínios (18).

A principal medida de controle das mastites por *M. bovis* é a detecção de animais infectados e o seu descarte precoce. Paralelamente, são recomendadas as medidas preventivas para as mastites contagiosas como a higiene de ordenha, imersão dos tetos em solução antisséptica antes e após a ordenha, desinfecção e manutenção dos equipamentos de ordenha (19), além da manutenção do ambiente de ordenha, e locais onde os animais são estabulados sempre limpos e higienizados, com retirada manual de fezes, lavagem e desinfecção (4).

Considerando-se a relevância desses micro-organismos na etiologia das mastites, investigou-se a presença de bactérias da classe *Mollicutes* em amostras de leite de vacas com mastite clínica, enviadas para análise microbiológica no Núcleo de Pesquisas em Mastites – NUPEMAS, no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP– Campus de Botucatu (SP), por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de leite foram coletadas, de quatro propriedades de pequeno porte (menos de 100 animais) da região de Botucatu/SP, após o processo de limpeza e desinfecção dos tetos (20) e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites – NUPEMAS, no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP– Campus de Botucatu (SP),

mantidas em temperatura de refrigeração. Foram alíquotadas em microtubos de 1,5 mL e mantidas congeladas a -20°C até o momento da extração do DNA sendo descongeladas em temperatura ambiente, até atingirem aproximadamente 20°C . Foram examinadas 170 amostras de leite provenientes de casos de mastite clínica, utilizando-se o kit comercial de extração *Blood genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante, e o material foi mantido congelado a -20°C até o momento da realização da PCR.

A amplificação do DNA para a classe *Mollicutes* foi feita utilizando-se os *Primers* MGSO (5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC 3') e GPO-3 (5' GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC 3'), com 270 pares de base (21) com perfil de ciclagem: cinco minutos a 94°C , trinta e cinco ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 min.

A visualização do material amplificado foi avaliada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de $0,025\mu\text{L}/\text{mL}$ de Brometo de Etídeo. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e a voltagem empregada foi de 65V. Após o término da corrida o gel foi visualizado em transluminador de luz UV (22) e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital.

Foram utilizados $8\mu\text{L}$ do material amplificado e como marcador de peso molecular $4\mu\text{L}$ de 100pb ladder (Invitrogen). Para todas as amostras foram acrescentados $2\mu\text{L}$ do tampão de corrida (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizada triagem para a detecção de micro-organismos pertencentes à classe *Mollicutes*, entretanto, todas as amostras foram negativas. Em caso de positividade seria pesquisada a participação de *Mycoplasma bovis* com a utilização de primers específicos.

Nos E.U.A., a partir da cultura do leite do tanque, estima-se que 8-10% das explorações tenham pelo menos um animal com mastite causada por micoplasma (6,23,24). Esses resultados devem estar relacionados ao número de animais dos rebanhos avaliados, pois sabe-se que a ocorrência de mastite por micoplasma é 15 vezes maior em rebanhos maiores, de alta produção (25), diferente do presente estudo, que analisou amostras de leite de casos clínicos de mastite em animais de rebanhos de pequeno porte.

Apesar dos surtos de mastite por *Mycoplasma* spp. serem provocados principalmente pela introdução de novos animais infectados nas explorações (11,24,26,27,28), alguns autores referem a possibilidade de outras vias de transmissão a partir de outros animais da propriedade, inclusive assintomáticos ou a partir de outros locais de infecção no mesmo animal, como vias respiratórias, articulações ou ouvido médio (24,29,30).

Os surtos de mastite por *Mycoplasma* spp. e *Mycoplasma bovis*, são iniciados por animais com glândulas mamárias infectadas, recém introduzidos, pertencentes ao próprio rebanho, assintomáticos. A infecção da glândula mamária poderá então ter origem na transmissão interna do agente, por via linfematogênica ou na transmissão durante a ordenha (31). Neste sentido, o controle de *Mycoplasma* spp. como agente contagioso de mastite por meio de medidas de biossegurança não é tão eficiente como para outros agentes patogênicos, existindo dados indicadores do aumento da sua incidência, preferivelmente em grandes rebanhos bovinos, com mais de 350 animais (25).

Trabalhando com amostras de leite provenientes de rebanhos de alta produção, com número maior de animais, Junqueira (12) e Salina et al. (13) obtiveram resultados expressivos da participação de *Mollicutes* como *M. bovis*, fato que chama a atenção para a importância do

diagnóstico quer seja microbiológico ou molecular, para melhorar a sensibilidade do diagnóstico de mastite.

CONCLUSÕES

Apesar dos resultados negativos com relação a participação de *Mollicutes* nas amostras de leite avaliadas, provavelmente por tratar-se de amostras de leite de casos de mastite clínica de propriedades leiteiras de pequeno porte, novos estudos devem ser realizados considerando-se a importância desse grupo de micro-organismos, especificamente do gênero *Mycoplasma*.

REFERÊNCIAS

1. Bressan M. Práticas de manejo sanitário em bovinos de leite. Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL; 2000.
2. Santos MC. Curso sobre manejo de ordenha e qualidade do leite. Vila Velha: UVV; 2001.
3. Guimarães FF, Nobrega DB, Richini-Pereira VB, Marson PM, De Figueiredo Pantoja JC, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* 2013;96(5):2866-72.
4. Langoni H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33(5):620-6.
5. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégias de controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole, Pirassununga: Ed Dos Autores; 2007.
6. Kirk JH, Mellenberger R. *Mycoplasma Mastitis in dairy cows.* *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1994;16:541-58.
7. Hale HH, Helmboldt CF, Plastringe WN, Stula EF. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *Cornell Vet.* 1962;52:582-91.
8. Aska G, Erno H. Evaluation of *Mycoplasma agalactiae* subs. *bovis* to species rank *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) comb nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1976;26(3):323-5.
9. Mettifogo E, Nascimento ER, Muller EE, Nascimento MGF, Freitas JC. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. *Rev Bras Med Vet.* 1996;18(1):22-5.
10. Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH. *Mycoplasmosis in animals.* Ames: Iowa State University Press; 1994. p.56-61.
11. Gonzalez RN, Wilson DJ. *Mycoplasma mastitis in dairy herds.* *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2003;19(1):199-221.
12. Junqueira NB. Mastite bovina por *Mycoplasma* spp.: dinâmica da infecção em propriedades de vacas leiteiras de alta produção [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2017.
13. Salina A, Guimarães FF, Dalanezi FM, Joaquim SF, Menozzi BD, Langoni H. Micoplasmose mamária, uma realidade nos rebanhos leiteiros: resultados preliminares.

- In: Anais do 7o Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite; 2017; Curitiba. Curitiba: CBQL; 2017.
14. Fan HH, Kleven SH, Jackwood MW. Application of polymerase chain reaction with arbitrary to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 1995;39(4):729-35.
 15. Philpot WN, Nickerson SC. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Editora Milkbuzz; 2002.
 16. Boughton E. *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet Bull.* 1979; 49:377-89.
 17. Bennet RH, Jasper DE. Immunosuppression of humoral and cell mediated responses in calves associated with inoculation of *Mycoplasma bovis*. *Am J Vet Res.* 1977;38(11):1731-8.
 18. Rosengarten R, Citti CO. Papel de Micoplasmas em ruminantes em infecção sistêmica. In: Stipkovits L, Rosengarten R, Frey J. *Micoplasmas de ruminantes: patogenicidade, diagnóstico, epidemiologia e genética molecular*. Bruxelas: Comissão Europeia; 1999. p.14 -7.
 19. Gunning RF, Shepherd PA. Outbreak of bovine *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet Rec.* 1996;139:23-4.
 20. Bramley AJ, Cullor JS, Erskine RJ, Fox LK, Harmon, RJ, Hogan JS, Nickerson SC, Oliver SP, Smith KL, Sordillo LM. Current concepts of bovine mastitis. In: Anais do 37o National Mastitis Council; 1996; Madison. Madison: NMC; 1996. p.64.
 21. van Kuppveld FJM, van der Logt JTM, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:2606-15.
 22. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
 23. Kunkel JR. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bulk milk. *Cornell Vet.* 1985;75:398-400.
 24. Fox LK, Hancock DD, Michelson A, Britten A. Bulk tank milk analysis: factors associated with appearance of *Mycoplasma* sp. in milk. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003;50(5):235-240.
 25. Thomas CB, Willeberg P, Jasper DE. Case-control study of bovine mycoplasmal mastitis in California. *Am J Vet Res.* 1981;42:511-5.
 26. Pretto LG, Müller EE, Freitas JC, Mettifogo E, Buzinhani M, Yamaguti M, et al. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesqui Vet Bras.* 2001;21(4):143-5.
 27. Bushnell RB. *Mycoplasma* mastitis. *Vet Clin North Am Large Anim Pract.* 1984;6(2):301-12.

28. Kirk JH, Lauerman LH. Mycoplasma mastitis in dairy cows. Compendium. 1994;16:541-58.
29. Mackie DP, Finlay D, Brice N, Ball HJ. Mixed Mycoplasma mastitis outbreak in a dairy herd. Vet Rec. 2000;147:335-6.
30. Lamm CG, Munson L, Thurmond MC, Barr BC, George LW. Mycoplasma otitis in California calves. J Vet Diagn Invest. 2004;16:397-402.
31. Fox LK, Kirk JH, Britten A. Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2005;52:153-60.

Recebido em:
Aceito em: