

ASPECTOS GERAIS SOBRE A MASTITE BOVINA CAUSADA POR *Mycoplasma* spp.

Nathália Brancato Junqueira¹

Hélio Langoni²

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite no mundo, e a sua produção é fundamental na economia brasileira. A mastite bovina é a causa de um dos maiores prejuízos na produção leiteira, e a origem desta enfermidade em 90% dos casos está associada a infecções bacterianas, sendo descrito na literatura 137 espécies de micro-organismos, de 35 diferentes gêneros causadores. O *Mycoplasma* spp., tem distribuição mundial e pode causar grave pneumonia em bezerros e mastite em vacas lactantes além de outros processos infecciosos. As mastites causadas por *Mycoplasma* spp. são relativamente comuns em grandes rebanhos leiteiros. Nos Estados Unidos já foi relatado 70% de rebanhos infectados, porém este patógeno ainda é subestimado no Brasil, onde se têm poucos relatos de sua ocorrência como agente causador de mastite, devido provavelmente a quantidade reduzida de laboratórios que incluem a análise de bactérias do gênero *Mycoplasma* em sua rotina. Isto provavelmente ocorre pela necessidade de meios seletivos e de condições especiais para o isolamento deste patógeno.

Palavras-chave: Leite, micoplasmose, bovinos, saúde do úbere.

GENERAL ASPECTS ABOUT BOVINE MASTITIS CAUSED BY *Mycoplasma* spp.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest dairy producers in the world, and its production is essential to Brazilian economy. Bovine mastitis is responsible for the biggest losses in milk production and the origin of this disease in 90% of cases are associated with bacterial infections, being described in the literature 137 species of microorganisms, caused by 35 different genres. *Mycoplasma* spp., has a worldwide distribution and can cause severe pneumonia in calves, mastitis in lactating cows and other infectious processes. The mastitis caused by *Mycoplasma* spp. are relatively common in large dairy herds. In United States it has been reported 70% of herds infected with this pathogen, but this microorganism is still underestimated in Brazil, where we have few reports of its occurrence as mastitis agent cause, this fact occurs probably due to the reduced number of laboratories that includes the analysis of *Mycoplasma* in your routine. This probably happen due to the need of selective media and special conditions for the isolation of this pathogen.

Keywords: Milk, mycoplasmosis, bovine udder health.

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

² Professor do Departamento de Higiene e Veterinária e Saúde Pública, FMVZ UNESP Botucatu.

ASPECTOS GENERALES SOBRE LA MASTITIS BOVINA CAUSADA POR *Mycoplasma* spp.

RESUMEN

Brasil es uno de los mayores productores de leche en el mundo, y su producción es esencial para la economía brasileña. La mastitis bovina es responsable por las mayores pérdidas en la producción de leche y el origen de esta enfermedad en el 90% de los casos están asociados con infecciones bacterianas, que se describen en la literatura 137 especies de microorganismos, causadas por 35 géneros diferentes. *Mycoplasma* spp., Tiene una distribución mundial y puede causar neumonía grave en terneros, la mastitis en vacas lactantes y otros procesos infecciosos. La mastitis causada por *Mycoplasma* spp. son relativamente comunes en los grandes rebaños lecheros. En Estados Unidos se ha informado de 70% de descuento en los rebaños infectados por este patógeno, pero este microorganismo todavía está subestimado en Brasil, donde tenemos algunos informes de su aparición como agente de la causa de mastitis, este hecho se produce, probablemente debido al reducido número de laboratorios que incluye el análisis de *Mycoplasma* en su rutina. Probablemente esto sucede debido a la necesidad de medios selectivos y condiciones especiales para el aislamiento de este patógeno.

Palabras clave: Leche, micoplasmosis, bovino salud de la ubre.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de leite no mundo ocupando a quinta posição no ranking mundial, com uma produção de 26 mil toneladas de leite fluído no ano de 2015 (1). O país vem apresentando taxas de crescimento populacional e conseqüente aumento da demanda láctea interna, entretanto a produção atual ainda é insuficiente para suprir o mercado interno.

Estima-se que a produção brasileira de leite relacione-se a 22.000.000 de vacas, em sua maioria mestiças, não especializadas, de propriedade de pequenos produtores, caracterizando-se com uma baixa produtividade de 1.340 litros/vaca/ano, com baixa qualidade do produto final (2). Vários aspectos devem ser considerados com relação a produção e produtividade leiteira, como por exemplo a genética dos animais, a nutrição, e muito importante o manejo higiênico-sanitário animal estabelecido na propriedade, principalmente no que se refere à qualidade do leite e controle das mastites (3).

Além da produção do leite ser fundamental na economia brasileira, devido a sua importante geração de renda e emprego no campo, ele também é considerado um produto essencial para a população, por ser um alimento de alto valor nutritivo e essencial em todas as fases da vida humana (2). Portanto ressalta-se a necessidade deste alimento exercer sua função nutricional de forma segura, ou seja, com ausência de patógenos que apresentem risco a saúde dos consumidores e que mantenham as suas características organolépticas (4).

A mastite bovina é a causa de um dos maiores prejuízos na produção leiteira, que pode se dar tanto pela queda na produção láctea, perda da qualidade do leite e até perda da função de quartos mamários infectados (5). Esta enfermidade tem por características um processo inflamatório da glândula mamária relacionadas a agressões físicas, químicas, térmicas ou microbianas. (6).

A origem deste processo inflamatório, segundo Philpot e Nickerson (7) em 90% de seus casos está associada a infecções bacterianas, e de múltipla etiologia (8), portanto além das perdas econômicas na qualidade e produção de leite, também deve-se enfatizar os riscos à saúde pública decorrentes das mastites, devido a presença de agentes patogênicos que podem

ser fatores de risco para humanos em decorrência da eliminação dos próprios patógenos ou de suas toxinas no leite (9,10).

A mastite pode ser caracterizada de duas formas. A mastite clínica, na qual os sinais da doença são evidentes, úbere com edema, hipertermia, rubor, sensibilidade à palpação, apresentando alterações no leite, como pus e/ou grumos (11). E a mastite subclínica, na qual não se observa alterações macroscópicas no leite ou sinais de inflamação da glândula mamária, porém observam-se alterações na composição físico-química do leite, além de queda na produção dos animais acometidos, bem como o aumento da contagem de células somáticas (CCS) (12).

No Brasil, a mastite subclínica é de extrema importância econômica, devido sua alta incidência variável de 44,88% a 97,0%, e queda na produção de leite de 25,4% a 43,0% (13). Comparando-se a produção de tetos positivos com seus homólogos negativos para vários patógenos em casos subclínicos de mastites, encontraram perdas na produção leiteira de 25,2% para *Streptococcus agalactiae*, 22,6% para *Staphylococcus aureus*, 19,1% para *Staphylococcus epidermidis* e 23,5% para *Corynebacterium bovis* (14).

A etiologia da mastite é complexa e multivariada, já tendo sido descrita na literatura 137 espécies de micro-organismos, de 35 diferentes gêneros causadores (15). Desta maneira faz-se necessária a identificação do micro-organismo causador da patologia para um efetivo controle. Destaca-se portanto, a importância do exame microbiológico com a utilização de meios de cultura especiais e em condições adequadas de incubação para que se possa melhorar a sensibilidade do diagnóstico microbiológico, evitando-se resultados falso negativos.

Os principais agentes contagiosos, a nível mundial, de mastite bovina são: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis* (8,16). *Mycoplasma* spp., tem distribuição mundial e pode causar grave pneumonia em bezerros, mastite em vacas lactantes e poliartrites (17). Já foi associado a ceratoconjuntivite (18), endometrites, salpingites, otites, aborto e seminovesiculite, nas quais todas foram reproduzidas experimentalmente (19).

MASTITES POR *Mycoplasma* spp.

As mastites causadas pelos patógenos do gênero *Mycoplasma* spp. são relativamente comuns em grandes rebanhos leiteiros (20), entretanto, este patógeno ainda é subestimado (21), principalmente no Brasil, onde se têm poucos relatos de sua ocorrência como agentes causadores de mastites. Sabe-se entretanto, que poucos são os laboratórios especializados e preparados para o seu diagnóstico, considerando condições de isolamento que exige atmosfera de CO₂, meios de cultura específicos e período para o isolamento de no mínimo 5 dias. Deve-se considerar ainda as características das colônias que são diminutas, havendo a necessidade de lupa para caracterização fenotípicas das colônias.

Apesar de várias espécies de *Mycoplasma* spp. já terem sido isoladas em casos de surtos de mastite bovina, *Mycoplasma bovis* é o patógeno de maior importância (20), ou seja, com maior patogenicidade, causando maior incidência de infecções nos rebanhos, considerando-se uma alta contagiosidade (22). Pode causar mastites clínicas, subclínicas ou crônicas e apesar de ser considerado um patógeno contagioso, a evolução da afecção se assemelha ao padrão de patógenos ambientais, com surtos de casos clínicos da doença (23). Uma vez que a mastite por *Mycoplasma* se estabelece, o animal afetado pode eliminar de 10⁶ a 10⁸ UFC por mL de leite, contaminando assim a ordenhadeira, as mãos do ordenhador e outras fômites, que se tornam importantes vias de transmissão para outros animais do rebanho (20).

Os sinais clínicos da mastite causada pelo *Mycoplasma bovis* incluem queda abrupta na produção de leite, mais de um quarto apresenta mastite, e aumento de casos que não

respondem a terapêutica. Clinicamente os animais se apresentam saudáveis apesar da mastite severa. O leite apresenta sedimento, semelhante a areia (24). Por sua vez, alguns sinais clínicos atípicos podem surgir nesta enfermidade, incluindo claudicação, edema das porções dos membros anteriores e poliartrites (25).

A introdução do *M. bovis* em rebanhos livres da infecção, se dá pela entrada de bezerras ou novilhas clinicamente saudáveis na propriedade, que são portadoras sãs do *Mycoplasma bovis* e uma vez introduzido o patógeno, em qualquer fase da vida dos animais, torna-se difícil a sua erradicação (26). Desta forma recomenda-se a avaliação clínica e microbiológica previamente a introdução de novos animais no rebanho, a partir da utilização de quarentena na propriedade.

Os bezerros podem manter o *M. bovis* em seu trato respiratório, por vários meses ou até anos, servindo como reservatório do patógeno (27). A disseminação deste agente no organismo do animal, na maioria das vezes, é via descendente, ou seja, afeta primeiramente o pulmão ou outros órgãos e posteriormente, via sanguínea alcança a glândula mamária (28).

O contato entre animais, por meio das vias respiratórias, canal dos tetos, trato genital, incluindo até inseminação artificial com sêmen contaminado são também vias de transmissão (27). Outra maneira da introdução acidental do patógeno em um rebanho, é por meio de fômites, como cânulas e seringas contaminadas, via intramamária (20).

Para o controle das mastites por *M. bovis* é necessário a detecção de animais infectados e a eliminação dos mesmos. Simultaneamente deve-se priorizar medidas preventivas para as mastites contagiosas como a higiene de ordenha, imersão dos tetos em solução antiséptica após a ordenha, desinfecção e manutenção adequada do equipamento de ordenha (29). Vale aqui também o conceito e a adoção de um programa de controle rigoroso na prevenção das mastites (30)

As perdas econômicas registradas nos EUA, por mastites causadas pelo *Mycoplasma bovis*, são estimadas em até \$108 milhões de dólares por ano com níveis de até 70% dos rebanhos infectados (31). Porém, em muitos países, é um patógeno subestimado, devido a quantidade reduzida de laboratórios que inclui a análise de *M. bovis* em sua rotina (21), considerando-se principalmente a necessidade de meios seletivos e de condições especiais para o seu isolamento.

O primeiro representante do gênero *Mycoplasma* spp. foi identificado em 1890, como *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides*, causador da pleuropneumonia contagiosa bovina, e subsequentemente os tipos semelhantes de micoplasmas foram chamados de micro-organismos semelhantes aos da pleuropneumonia (PPLo) (20). A partir de um surto de mastite bovina, em 1961, *Mycoplasma bovis* foi isolado pela primeira vez, nos Estados Unidos (32), tendo sido inicialmente diagnosticado como *Mycoplasma bovimastitidis*. Apenas em 1976, após diversos estudos baseados em técnicas moleculares, deu-se então a classificação de *Mycoplasma bovis* (33).

A partir de então, devido ao grande trânsito de animais (21), o *Mycoplasma bovis* tem sido descrito em diversos países, como Israel (1964), Espanha (1967), Austrália (1970), França (1974), Inglaterra (1975), Checoslováquia (1975), Alemanha (1977), Dinamarca (1981), Suíça (1983), Marrocos (1988), Coreia do Sul (1989), Irlanda do Norte (1993), República da Irlanda (1994), Chile (2000) (21), Grécia (34), Bósnia Herzegovina (35), Itália (36) e Japão (2000) (37).

No Brasil, a primeira citação de casos de mastite por esse patógeno foi de Mettifogo et al. (38), na região de Londrina-PR, evidenciando a importância deste patógeno na etiologia da mastite. Pretto et al. (24), também contribuíram para o levantamento deste micro-organismo na região norte do Paraná e sudoeste do Estado de São Paulo, trabalhando com 713 animais provenientes de três propriedades leiteiras, entre as quais de 137 que apresentavam mastite, oito eram causadas por *Mycoplasma bovis*, correspondente a 5,83% dos casos.

Trabalhando com amostras de tanque de expansão de cinco propriedades do centro-oeste paulista, Langoni et al. (39) obtiveram por PCR positividade para o gênero *Mycoplasma* spp. em amostras de leite de uma propriedade pela reação em cadeia polimerase PCR. Por outro lado, Manzi et al., (40) avaliando a prevalência de *Mycoplasma* spp. no leite de tanques de expansão em 68 propriedades na região de Botucatu, São Paulo, coletando três amostras de leite em períodos diferentes de cada propriedade, totalizando 204 amostras de leite, obtiveram 12 amostras de leite positivos pela PCR para *Mycoplasma* spp. sendo que destes uma foi positiva para *Mycoplasma bovis*. Os autores concluem pela importância de se incluir o diagnóstico deste grupo de patógenos no diagnóstico das mastites, subclínicas e clínicas, para melhor avaliação do seu papel nas infecções intramamárias.

A literatura relata prevalência de 0,5 a 35% de mastite causada por *Mycoplasma bovis* em diversos países (41). Porém devido às necessidades especiais requeridas para a cultura e isolamento de *Mycoplasma*, no Brasil, a pesquisa desse agente, tanto nas mastites como em outras patologias dos sistemas respiratório, urogenital, articular, sistema nervoso e conjuntiva ocular são pouco frequentes (42), e há uma necessidade de incrementá-los para se conhecer melhor os aspectos de etiopatogenia desse grupo de micro-organismos de suma importância em Medicina Veterinária.

Os micoplasmas pertencem a classe *Mollicutes*, gênero *Mycoplasma*, tais micro-organismos se diferem de outras bactérias pela ausência de parede celular rígida, são células delimitadas apenas pela unidade trilaminar da membrana (17). Sendo assim, são considerados altamente pleomórficos, e capazes de produzir filamentos que parecem fungos, daí o seu nome (*mykes* = fungo e *plasma* = formato) (43).

As células do gênero *Mycoplasma* são pequenas, variando de 0,1 a 0,25µm, com um volume celular que representa em torno de 5% do volume de um bacilo típico. Devido ao seu tamanho e plasticidade sua passagem é possível por meio dos filtros que retêm bactérias comuns, sendo assim estes organismos foram inicialmente considerados como vírus (43).

A ausência de parede celular bacteriana típica, contendo peptidoglicano, torna estes micro-organismos insensíveis aos agentes antimicrobianos contra parede celular, como as penicilinas e cefalosporinas, podendo implicar em perdas econômicas caso não seja feito um diagnóstico adequado. Todavia, são suscetíveis à dessecação, ao aquecimento, a detergentes e desinfetantes (17).

Os *Mycoplasmas* podem representar os menores organismos autoreplicáveis capazes de sobreviver como células livres (43). Em virtude do seu “QI” genético mais baixo, esses micro-organismos possuem uma capacidade limitada de realizar biossíntese, portanto o cultivo de micoplasmas exige meios enriquecidos contendo precursores desta biossíntese (17). Em sua maioria são anaeróbios facultativos, sendo que alguns crescem otimamente em uma atmosfera de 5 a 10% de CO₂, (17) e suas colônias têm menos de 1 mm de diâmetro e uma aparência característica de “ovo frito” quando vistas sob luz transmitida com auxílio de lupas (43).

Portanto, como alternativa aos métodos convencionais de detecção de *Mycoplasma*, existe a reação em cadeia da polimerase (PCR) que é acurado e amplamente aceito como um método confiável para detecção de *Mycoplasma* spp. em amostras de leite (44-47). Permitindo assim um rápido diagnóstico, e prevenção de possíveis surtos de mastites causadas por esse agente. Diversos estudos têm demonstrado a eficácia da PCR para a detecção *Mycoplasma* spp. (48).

Além da PCR tradicional, segundo Justice-Allen e colaboradores (49), outra ferramenta que pode ser utilizada é a PCR em tempo real. Esta técnica facilita a identificação de *Mycoplasma bovis*, auxilia na identificação de outras espécies de micoplasmas e identifica coinfeções por diferentes espécies de micoplasmas em uma mesma amostra, pela análise de

temperatura de dissociação. Além desse aspecto essa técnica permite avaliar a carga bacteriana presente na amostra de leite examinada.

Para se realizar uma cultura e isolamento de micoplasmas são necessários meios e tempo de incubação especiais, além de condições de microaerofilia. Tendo em vista a frequência de amostras de leite de vaca com alterações sugestivas de mastite, clínica ou subclínica, apresentarem-se negativas a sucessivas culturas realizadas a partir de métodos microbiológicos padrões, pode-se suspeitar de um subdiagnóstico de mastite por *Mycoplasma* (50). Novos estudos são importantes para que se possa avaliar realmente o papel dos micoplasmas enquanto patógeno especialmente nas mastites.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite causada por *Mycoplasma* spp. já é relatada pela literatura por sua fundamental importância econômica em diversos países, porém ela ainda é subestimada no Brasil devido a falta de estudos relacionado a esta temática. Devido a alta contagiosidade do patógeno e aos diversos problemas que ele pode causar em uma propriedade, como doenças respiratórias, reprodutivas, poliartrites, entre outras, é de grande valia o aprofundamento da micoplasmologia na etiologia das mastites no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. United States Department of Agriculture (USDA). Agricultural Research Service, 2016. Dairy: World Markets and Trad; 2016 [cited 2016 July 14]. Available from: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>>
2. Zoccal R, Gomes AT. Zoneamento da produção de leite no Brasil. In: Anais do XIII Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural; 2005; Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural; 2005.
3. Domingues PF, Langoni H. Manejo sanitário animal. 1a ed. Rio de Janeiro: Epub; 2001.
4. Fonseca MI. Influência do processo de ordenha manual na qualidade do leite cru produzido em propriedade rural familiar. Vet Zootec. 2013;20:393-4.
5. Ribeiro MER, Petrini LA, Aita MF, Balbinotti M, Stumpf Junior W, Gomes JF, et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. Rev Bras Agrocienc. 2003;9:287-90.
6. Tozzetti DS, Bataier MBN, Almeida LRD, Piccinin A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. Rev Cient Eletronica Med Vet. 2008;6:1-7.
7. Philpot WN, Nickerson SC. Mastitis: counter attack. Naperville: Babson Bros; 2001.
8. Langoni H, Silva AV, Cabral KG, Domingues PF, Silva AV. Aspectos etiológicos na mastite bovina. Rev Bras Med Vet. 1998;20:204-10.
9. Costa EO. Importância da mastite na produção leiteira do país. Rev Educ Contin CRMV-SP. 1998;1:3-9.

10. Freitas Guimarães F, Nóbrega DB, Richini-pereira VB, Marson PM, Pantoja JCF, Langoni H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* 2013;96:2866-72.
11. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle de mastites. São Paulo: Lemos editorial; 2000.
12. Cullor JS, Tyler JW, Smith BP. Distúrbios da glândula mamária. In: Smith BP. Tratado de medicina interna dos grandes animais. São Paulo: Manole; 1994. p.1041-60.
13. Brant MC, Figueiredo JB. Prevalência da mastite subclínica e perdas de produção em vacas leiteiras. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1994;46:595-606.
14. Domingues PF, Langoni H, Padovani CR. Influência da mastite bovina subclínica sob a produção de leite. *Vet Zootec.* 1998;10:99-106.
15. Watts JL. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 1998;16:41-66.
16. Jayarao BM, Pillai SR, Sawant AA, Wolfgang DR, Hegde NV. Guidelines for monitoring bulk tank somatic cell and bacterial counts. *J Dairy Sci.* 2004;87:3561-73.
17. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Micoplasmas. In: *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.* Porto Alegre: Artmed; 2005. p.193-9.
18. Kirby FD, Nicholas RA. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bullocks' eyes. *Vet Rec.* 1996;138:552.
19. Ruhnke HL. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. In: Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH. *Mycoplasmosis in animals.* Ames: Iowa State University Press; 1994. p.56-61.
20. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. Causas bacterianas de mastite bovina. In: *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.* Porto Alegre: Artmed; 2005. p.451-60.
21. Nicholas RAJ, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci.* 2003;74:105-12.
22. Bushnell RB. *Mycoplasma mastitis.* Symposium on mastitis. *Vet Clin North Am Large Anim Pract.* 1984;6:301-12.
23. Bramley J. Identifying mastitis problems and strategies for control. In: *Proceedings of the 31st National Mastitis Council;* 1992; Arlington. Arlington: National Mastitis Council; 1992. p.5-14.
24. Pretto LG, Muller EE, Freitas JC, Mettifogo E, Buzihani M, Yamaguti M, et al. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesqui Vet Bras.* 2001;21:143-5.

25. Wilson DJ, Skirpstunas RT, Trujillo JD, Cavender KB, Bagley CV, Harding RL. Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first-lactation cows in a closed commercial dairy herd. *J Am Vet Med Assoc.* 2007;230:1519-23.
26. Gourlay RN, Thomas LH, Wyld SG. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. *Vet Rec.* 1989;124:420-2.
27. Pftzner H. Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle. *Zentralblatt Bakteriologie.* 1990; Suppl 20:394-9.
28. 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.
29. Gunning RF, Shepherd PA. Outbreak of bovine *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet Rec.* 1996;139:23-4.
30. Langoni H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33:620-6.
31. Rosengarten R, Citti C. The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection. In: Stipkovits L, Rosengarten R, Frey J. *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics.* Brussels: European Commission; 1999. p.14-7.
32. Hale HH, Helmboldt CF, Plastringe WN, Stula EF. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Vet.* 1962;52:582-91.
33. Askaa G, Ernø H. Evaluation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to species rank *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) comb nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1976;26:323-5.
34. Filioussis G, Christodouloupoulos G, Thatcher A, Petridou V, Bourtzi-Chatzopoulou E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. *Vet J.* 2007;173:215-8.
35. Rifatbegovic M, Assunção P, Poveda JB, Pasic S. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina. *Vet Rec.* 2007;160:484-5.
36. Radaelli E, Luini M, Loria GR, Nicholas RAJ, Scanziani E. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Res Vet Sci.* 2008;85:282-90.
37. Maeda T, Shibahara T, Kimura K, Wada Y, Sato K, Imada Y, et al. *Mycoplasma bovis* - associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *J Comp Pathol.* 2003;129:100-10.
38. Mettifogo E, Nascimento ER, Müller EE, Nascimento MGF, Freitas JC. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. *Rev Bras Med Vet.* 1996;18:22-5.

39. Langoni H, Fernandes SJ, Manzi MP. Qualidade do leite: pesquisa de *Mycoplasma* spp. em tanques de expansão pela reação em cadeia da polimerase – PCR. Vet Zootec. 2013;20:32-3.
40. Manzi MP, Langoni H, Joaquim SF. Prevalência de *Mycoplasma* spp. em leite de tanques de expansão da região de Botucatu-SP. Vet Zootec. 2013;20:384-5.
41. González RN, Wilson DJ. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2003;19:199-221.
42. Buzinhani M, Metiffogo E, Timenetsky J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivo. Arq Bras Med Vet Zootec. 2007;59:1368-75.
43. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Procariotos: domínios bacteria e archaea. In: Microbiologia. Porto Alegre: Artmed; 2012. p.319-20.
44. Ghadersohi A, Coelen RJ, Hirst RG. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. Vet Microbiol. 1997;56:87-98.
45. Baird SC, Carman J, Dinsmore RP, Walker RL, Collins JK. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest. 1999;11:432-5.
46. Riffon R, Sayasith K, Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagacé J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J Clin Microbiol. 2001;39:2584-9.
47. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-based detection of *Mycoplasma* species. J Microbiol. 2006;44:42-9.
48. Cardoso MV, Blanchard A, Ferris S, Verlengia R, Timenetsky J, Florio da Cunha RA. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. Vet Microbiol. 2000;72:241-50.
49. 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. 2011;94:3411-9.
50. Philpot WN, Nickerson SC. Vencendo a luta contra a mastite. São Paulo: Milkbuzz; 2002.

Recebido em: 10/03/2016

Aceito em: 08/08/2016