

**INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE**

**Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação**

**Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal**



**Dissertação**

**Detecção molecular de *Mollicutes* e *Mycoplasma* spp. em amostras de leite, com ausência de crescimento no isolamento microbiológico convencional e colhidas de vacas com quadros de mastite**

**Eliete Griebeler**

**Concórdia, 2019**

**Eliete Griebeler**

**Detecção molecular de *Mollicutes* e *Mycoplasma* spp. em amostras de leite, com ausência de crescimento no isolamento microbiológico convencional e colhidas de vacas com quadros de mastite**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

**Orientador:** Prof. Dr. Diogenes Dezen

**Coorientadores:** Profa. Dra. Marcella Z. Troncarelli

Profa. Dra. Teane A. M. S. Gomes

**Concórdia, 2019**

Griebeler, Eliete.

Detecção molecular de *Mollicutes* e *Mycoplasma* spp. em amostras de leite, com ausência de crescimento no isolamento microbiológico convencional e colhidas de bovinos com quadro de mastite./Eliete Griebeler-2019.

Páginas 39.

Orientador: Diogenes Dezen

Coorientadores: Marcella Z. Troncarelli; Teane A. M. S. Gomes

Dissertação (Mestrado Profissional) / Instituto Federal Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal.

1. Bovinocultura Leiteira; 2. Infecção Intramamária; 3. Micoplasmose; 4. Reação em Cadeia de Polimerase

**Eliete Griebeler**

**Detecção molecular de *Mollicutes* e *Mycoplasma* spp. em amostras de leite, com ausência de crescimento no isolamento microbiológico convencional e colhidas de vacas com quadros de mastite**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

**Data da Defesa: 25/07/2019**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Diogenes Dezen (Orientador)**

**Doutor em Microbiologia Veterinária pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Profa. Dra. Soraya Sacco Surian**

**Doutora em Clínica Veterinária pela Universidade Estadual Paulista**

**Msc. Franciele Rampazzo Vancin**

**Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área: Qualidade e Propriedades Funcionais de Alimentos pela Universidade de Passo Fundo**

## Agradecimentos

Nesse período de realização do mestrado, com muito estudo, esforço, empenho e dedicação, chega o momento de agradecer a todos que me acompanharam e foram essenciais para a realização de mais este sonho.

Inicialmente, agradeço a Deus por iluminar meu caminho e me dar força para seguir em frente, não deixando faltar saúde e lucidez para encarar esse desafio.

À minha família que sempre apoiou e incentivou todas as minhas escolhas. Agradeço a meu marido Marciel, pelo amor, carinho e incentivo, és um exemplo de companheirismo e dedicação.

Agradeço imensamente ao meu orientador, professor Diogenes Dezen, obrigada por todas as orientações, conselhos e colaboração, tenho certeza que sem a sua participação, não teria conseguido chegar até aqui. Obrigada pelo apoio, acompanhamento e atenção na execução de todas as partes do projeto, você é um exemplo de pessoa e de profissional.

Igualmente, agradeço ao comitê de orientação. À professora Marcella Troncarelli, pelo constante incentivo e apoio inigualável, obrigada pela parceria no curso de capacitação, na padronização da técnica e na revisão da dissertação. À minha querida coorientadora Teane Gomes, sempre disponível para auxiliar no que for preciso, seja na elaboração da dissertação ou no “empréstimo” de reagentes.

Agradeço a todos os colegas de turma, pela parceria em estudos, viagens e momentos alegres. Em especial às “gurias do mestrado” Alcione, Talita, Adriana e Taís, pelo companheirismo e por toda ajuda com as disciplinas e dissertação. À minha querida amiga Alci, pela grande amizade e companheirismo, onde em diversos momentos, tivemos que nos ajudar na elaboração dos trabalhos, pois temos formação acadêmica de áreas diferentes da maioria dos nossos colegas.

Meu profundo agradecimento à equipe LMV pela compreensão, fortalecimento e união na realização dos projetos. Sou muito grata por fazer parte desta equipe.

Agradeço à Unesp-Botucatu, ao Doutor Hélio Langoni e à doutoranda Anelise Salina pelo fornecimento das cepas de *Mycoplasma arginini*.

Agradeço ao CNPq pelo fornecimento da bolsa de pesquisa, custeando a realização desta pesquisa. Da mesma forma agradeço as bolsistas de iniciação científica, Shaiana Maciag, Mylena Valmorbida e Suele Dalbello, pelo auxílio na parte inicial desta pesquisa.

Agradeço ao Instituto Federal Catarinense, por permitir e incentivar a qualificação dos servidores e também pelo Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal. Da mesma forma, agradeço a todos os docentes, técnicos administrativos e coordenadores do IFC, engajados para a realização e consolidação do mestrado profissional.

Meu profundo agradecimento à Embrapa Suínos e Aves de Concórdia-SC, em especial aos pesquisadores Alexandre Tessmann, Adriana Ibelli e Paulo Esteves, por permitir e auxiliar na realização da quantificação das amostras de DNA.

Agradeço às minhas colegas e amigas, Kelen Baldi e Silvia Fontes, que sempre estiveram dispostas a me escutar, ajudar, acalmar e orientar. Meus dias são mais alegres com vocês do meu lado.

Enfim, agradeço a todos que me auxiliaram, direta ou indiretamente, na concretização desse sonho, mais uma vez, muitíssimo obrigado!

*O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas  
admiráveis” (José de Alencar)*

## Resumo

GRIEBELER, Eliete. **Detecção molecular de *Mollicutes* e *Mycoplasma* spp. em amostras de leite, com ausência de crescimento no isolamento microbiológico convencional e colhidas de vacas com quadros de mastite.** 2019. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2019.

A mastite é o principal desafio sanitário presente nas propriedades leiteiras, sendo altamente prevalente e acarretando em significativas perdas econômicas para o setor. Para controlar a ocorrência de mastite é necessário o conhecimento da sua etiologia. Entre os agentes responsáveis por surtos da doença, destaca-se o gênero *Mycoplasma*, o qual necessita de técnicas específicas de diagnóstico para a sua detecção. Em Santa Catarina não estão disponíveis dados sobre a presença deste micro-organismo no leite. Com isso, o objetivo deste estudo foi detectar, através de um ensaio de PCR, a presença de bactérias da classe *Mollicutes* e do gênero *Mycoplasma* em amostras de leite negativas ao isolamento microbiológico convencional, colhidas de bovinos com mastite. Para isso, foram utilizadas 187 amostras de leite de rebanhos bovinos leiteiros do Estado de Santa Catarina. As amostras foram submetidas a protocolos de extração de DNA utilizando o método fenol-clorofórmio, posteriormente foi realizada a PCR para a classe *Mollicutes* e as amostras positivas, foram submetidas à PCR para o gênero *Mycoplasma*. Posteriormente, os fragmentos de DNA obtidos na amplificação por PCR gênero-específica foram clonados, os clones recombinantes foram sequenciados e as sequências de DNA obtidas foram submetidas a análise de homologia. Das amostras analisadas, 1,6% foram positivas para *Mollicutes* e 1,1% apresentaram amplificação para a PCR gênero-específico, porém no sequenciamento não se observou homologia com o gênero *Mycoplasma*. Com isso, evidencia-se a presença desta classe bacteriana em amostras de leite mastítico, no estado de Santa Catarina, permitindo a inclusão destes micro-organismos na suspeita etiológica de quadros de mastite.

**Palavras-chave:** Bovinocultura Leiteira; Infecção Intramamária; Micoplasmose; Reação em Cadeia de Polimerase.



## Abstract

GRIEBELER, Eliete. **Molecular detection of *Mollicutes* and *Mycoplasma* spp. in milk samples, with absence of growth in conventional microbiological isolation and from bovines with mastitis.** 2019. 39f. Dissertation (Master degree in Science) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2019.

Mastitis is the main health challenge present in dairy farms, being highly prevalent and leading to significant economic losses for the sector. The control of mastitis is based on the diagnosis of the etiologic agent. Among the agents responsible for outbreaks of the disease, the genus *Mycoplasma* stands out, which needs specific diagnostic techniques for its detection. In Santa Catarina, data on the presence of this microorganism in milk are not available. In this regard, the study aiming to detect, through a PCR assay, the presence of bacteria from *Mollicutes* class and *Mycoplasma* genus, in milk samples negative to conventional microbiological isolation from cows with mastitis. For this purpose, a total of 187 milk samples of mastitis cases from dairy herds of the State of Santa Catarina were used. The samples were submitted to DNA extraction protocols using the phenol-chloroform method, thereafter the PCR was performed to identify the *Mollicutes* class. The positive samples were submitted to a new PCR reaction to the genus *Mycoplasma*. Subsequently, DNA fragments obtained in the genus-specific PCR amplification were cloned, the recombinant clones were sequenced and the DNA sequences obtained were subjected to homology analysis. Of the analyzed samples, 1.6% were positive for *Mollicutes* and 1.1% presented amplification for the genus-specific PCR, but the sequencing did not verify homology with the genus *Mycoplasma*. Therefore, the presence of this bacterial class in mastitic milk samples in Santa Catarina state was reported, allowing the inclusion of these microorganisms in the etiological suspicion of mastitis.

**Keywords:** Dairy Cattle; Intramammary Infection; Mycoplasmosis; Polymerase Chain Reaction.

## Lista de Figuras

Figura 1	Eletroforese da PCR para <i>Mollicutes</i> em gel de agarose 1,5%.....	21
Figura 2	Eletroforese da PCR para <i>Mycoplasma</i> spp. em gel de agarose 1,5%....	21

## Sumário

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE.....	10
1.1	Bovinocultura leiteira e mastite.....	10
1.2	Infecções em bovinos leiteiros por <i>Mycoplasma spp</i> .....	11
1.3	Diagnóstico e Prevalência de <i>Mycoplasma spp</i> .....	12
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1	Geral.....	15
2.2	Específicos.....	15
3	ARTIGO.....	16
3.1	Introdução.....	17
3.2	Materiais e Métodos.....	18
3.2.1	Local e amostras.....	18
3.2.2	Extração de DNA.....	18
3.2.3	Reação em Cadeia de Polimerase.....	19
3.2.4	Clonagem gênica e extração do DNA plasmidial.....	20
3.2.5	Sequenciamento e análise de similaridade.....	20
3.3	Resultados.....	21
3.4	Discussão.....	22
3.5	Conclusão.....	23
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
5	REFERÊNCIAS.....	25
	ANEXO.....	30
	APÊNDICE.....	31

## **1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE**

### **1.1 Bovinocultura leiteira e mastite**

O Estado de Santa Catarina vem se destacando nacionalmente na bovinocultura leiteira, sendo que nos anos de 2006 a 2017 apresentou crescimento de 92% no volume produzido, enquanto o aumento na produção brasileira foi de 32% neste mesmo período (Embrapa, 2018).

Com isso, surgem novos desafios para o sistema. Entre os principais problemas sanitários da pecuária leiteira, se destaca a mastite. Esta é uma doença onerosa e altamente prevalente em propriedades leiteiras, gerando altos custos para a produção, acarretando perdas econômicas pela redução da produção leiteira, baixa qualidade do leite, descarte de leite, perda de animais e custos de tratamento (Johnzon et al., 2016).

Esta enfermidade decorre de um processo inflamatório na glândula mamária, em sua maioria ocasionada pela resposta a uma infecção intramamária, evidenciada por alterações patológicas no tecido glandular, ocasionando modificações no leite, como dessora, alteração da coloração, presença de grumos e mudança na viscosidade (Peres & Zappa, 2011).

A mastite bovina pode se apresentar na forma clínica ou subclínica, caracterizada pela presença ou ausência de sinais clínicos, respectivamente (Albuquerque et al., 2017). Nos casos clínicos o quarto mamário acometido apresenta edema, hipertermia, rubor e o leite contém grumos, já na mastite subclínica os sinais inflamatórios estão ausentes, porém ocorrem alterações na composição do leite e diminuição da produção (Junqueira & Langoni, 2016).

Dentre as causas mais frequentes de mastite estão as infecciosas, sendo a maioria induzida por patógenos bacterianos. A mastite bacteriana é caracterizada de acordo com a sua epidemiologia como mastite contagiosa e ambiental. Na mastite contagiosa o úbere do animal infectado é utilizado como reservatório principal para os patógenos, onde as bactérias são transmitidas entre as vacas durante a ordenha, ocasionando infecções crônicas

com mastite subclínica e episódios clínicos. Entre os patógenos contagiosos destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp. e *Corynebacterium bovis* (Abebe et al., 2016). Por outro lado, os patógenos causadores da mastite ambiental são encontrados no ambiente e causam episódios de mastite clínica e casos crônicos, incluindo principalmente neste grupo as bactérias *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Escherichia coli* (Cameron et al., 2016).

## **1.2 Infecções em bovinos leiteiros por *Mycoplasma* spp.**

Bactérias do gênero *Mycoplasma* são os menores organismos de vida livre auto-replicáveis, causadores de quadros de mastites crônicas, clínicas e subclínicas, pertencem à classe *Mollicutes*, a qual é caracterizada pela ausência de parede celular (Gonzalez & Wilson, 2003). As espécies patogênicas deste gênero colonizam superfícies de mucosas, incluindo o trato respiratório e urogenital, olhos e glândula mamária, bem como as articulações (Razin et al., 1998).

Existem 25 espécies de *Mycoplasma* que foram detectadas em bovinos, porém somente algumas estão associadas à mastite bovina, como *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma dispar*, *Mycoplasma canadense* e *Mycoplasma bovoculi*, sendo a espécie *Mycoplasma bovis* a mais prevalente e importante clinicamente (Gonzalez & Wilson, 2003; Maunsell et al., 2011; Fox, 2012).

*M. bovis* foi isolado inicialmente em 1961 nos Estados Unidos em um surto de mastite severa em uma fazenda, afetando 30% do rebanho (Hale et al., 1962). Originalmente foi designado *Mycoplasma agalactiae* var. *bovis* devido à sua semelhança bioquímica, imunológica e genética com *Mycoplasma agalactiae*, sofrendo reclassificação posteriormente (Nicholas et al., 2016). Este patógeno tem sido associado às doenças respiratórias e reprodutivas, mastite, otite e ceratoconjuntivite, sendo considerado um patógeno emergente em rebanhos de países industrializados (Barberio et al., 2016). Propriedades com elevado número de animais, fazendas do tipo corporativas e aquisição de animais externos, estão relacionadas com a maior prevalência deste patógeno (Murai & Higuchi, 2019).

Apesar da resposta imune agressiva, este micro-organismo apresenta características que possibilitam a colonização e sobrevivência nas mucosas e invasão de tecidos. Entre as particularidades, que provavelmente aumentam a patogênese, destaca-se a variação antigênica, invasão, imunomodulação, formação de biofilme e produção de metabólitos tóxicos (Maunsell, 2011).

Em relação à formação de biofilmes, destaca-se que, em bactérias que apresentam esta característica, são persistentes as ações de resistência frente ao hospedeiro; à antibioticoterapia e ao processo de aquecimento e dessecação, quando comparadas às bactérias planctônicas (McAuliffe et al., 2006).

A principal forma de transmissão entre os animais ocorre por meio de equipamentos de ordenha ou pelas mãos de ordenhadores, e a infecção da glândula mamária geralmente persiste entre as lactações (Gonzalez & Wilson, 2003). Em fazendas endêmicas para *M. bovis*, bezerros são expostos a esta bactéria durante o parto, através da ingestão de leite e também pela contaminação ambiental (Wawegama & Browning, 2017).

Bactérias deste gênero são altamente contagiosas, pouco responsivas ao tratamento antimicrobiano. Com isso, o controle estratégico desta bactéria baseia-se na segregação e descarte de animais infectados, evidenciando-se a necessidade de sua adequada detecção para evitar surtos de mastite por este patógeno (Higuchi et al., 2011; Timonen et al., 2017).

As perdas econômicas causadas pela infecção mamária do gênero *Mycoplasma*, incluem a mastite persistente, com redução da produção leiteira e diminuição da qualidade do produto (Radaelli et al., 2011). A manifestação dos sinais clínicos relacionados a este patógeno incluem agalaxia em mais de um quarto mamário (Junqueira & Langoni, 2016), apresentando no leite um sedimento semelhante a areia, de difícil tratamento (Pretto et al., 2001). Após o período inicial de mastite clínica, os animais afetados evoluem para mastite crônica (Langoni et al., 2017).

### **1.3 Diagnóstico e Prevalência de *Mycoplasma* spp.**

O padrão ouro de diagnóstico para a identificação do agente etiológico da mastite é a cultura bacteriana (Oultram et al., 2017), porém a mesma é laboriosa, relativamente demorada e sofre influência de diversos fatores, tais como, coleta/armazenamento

inapropriado, antibioticoterapia prévia e padrão de excreção intermitente do patógeno, o que leva à falha na detecção do agente etiológico (Buzinhani et al., 2007). Além disso, algumas bactérias fastidiosas não são detectadas quando utilizadas a técnica de isolamento microbiológico convencional, como é o caso do *M. bovis*.

Assim, devido às suas limitações de crescimento no isolamento microbiológico convencional, esta bactéria necessita ser diagnosticada por técnicas de elevadas sensibilidade e especificidade. A cultura bacteriológica para *Mycoplasma* spp. é pouco sensível, pois a mesma necessita de meios, equipamentos e tempo de incubação especiais. Mesmo com a disponibilização destes fatores, seu crescimento pode sofrer influência do tipo de amostra, da forma da coleta e transporte e da presença de bactérias viáveis na amostra (Manzi, 2018).

Nesse sentido, o diagnóstico por meio da técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) se torna uma importante ferramenta para a identificação do *Mycoplasma*, pois devido a mesma identificar o DNA alvo do organismo testado, a viabilidade da amostra e fatores ligados à manipulação e armazenamento das amostras apresentam menor importância para o êxito do teste (Parker et al., 2017).

Baseado em pesquisas em leite de tanque, a frequência deste patógeno apresenta valores de prevalência variáveis entre os países. Na União Europeia, varia de 1 a 5,4% (Filioussis et al., 2007; Arcangioli et al., 2011; Passchyn et al., 2012). No Japão, a prevalência estimada é de 3,8% (Murai & Higuchi, 2019) e nos Estados Unidos a prevalência de *Mycoplasma* é de 3,2% (APHIS-USDA, 2008). Em pesquisas realizadas na Nova Zelândia, não foram encontradas amostras positivas para *M. bovis* e também para nenhuma outra espécie de *Mycoplasma* (McDonald et al., 2009).

No Brasil, dados sobre a prevalência de mastite por *Mycoplasma* são escassos. Em um estudo envolvendo três propriedades leiteiras no Paraná e São Paulo, Pretto et al. (2001), verificaram 1,12% de prevalência de *M. bovis* nos rebanhos avaliados. Outro estudo realizado no interior de São Paulo, demonstrou que 1,4% das amostras de leite composto obtidas de tanques resfriadores foram positivas para este agente (Manzi, 2018). Novamente em São Paulo, Francheschini et al., 2006, avaliaram animais com mastite clínica e subclínica, porém não encontraram amostras positivas para o gênero *Mycoplasma*.

Não estão disponíveis na literatura estudos com dados sobre a ocorrência de *Mycoplasma* em rebanhos leiteiros do estado de Santa Catarina, dessa forma, propôs-se o presente estudo para pesquisa referente a este patógeno causador de mastite, permitindo assim a elucidação diagnóstica de casos de mastite clínica ou subclínica, a partir de amostras de leite que apresentaram ausência de crescimento microbiológico no exame bacteriológico convencional.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Detecta a presença de *Mollicutes* e *Mycoplasma* spp. em amostras de leite de bovinos com mastite, as quais apresentaram ausência de crescimento no isolamento microbiológico convencional.

### **2.2 Específicos**

- Realizar o cultivo bacteriológico convencional a partir de amostras de leite obtidas de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina, para fins de triagem das amostras negativas a serem incluídas neste estudo;
- Padronizar um protocolo de PCR para detecção de *Mollicutes* e *Mycoplasma* spp. nas amostras de leite.

### 3 ARTIGO

#### **Detecção molecular de *Mollicutes* e *Mycoplasma* spp. em amostras de leite de bovinos com mastite e ausência de crescimento no isolamento microbiológico**

Manuscrito a ser submetido no Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia  
(<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>)

---

#### **Autores:**

**ELIETE GRIEBELER<sup>1</sup>, MARCELLA Z. TRONCARELLI<sup>2</sup>, TEANE A. M. GOMES<sup>1,2</sup>, ALEXANDRE  
TESSMANN<sup>3</sup>, HELIO LANGONI<sup>4</sup>, DIOGENES DEZEN<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Produção e Sanidade Animal, Instituto Federal  
Catarinense-IFC, Concórdia, SC, Brasil

<sup>2</sup>Docente do IFC-Concórdia

<sup>3</sup>Técnico Embrapa Suínos e Aves

<sup>4</sup>Docente da UNESP-Botucatu

### 3.1 Introdução

A mastite é considerada a doença mais frequente e onerosa para o setor de produção leiteira (Halasa, 2007). A sua importância na indústria leiteira está ligada ao decréscimo da produção e a redução da qualidade do leite (Murai & Higuchi, 2019). Esta enfermidade induz perdas diretas, relacionadas ao diagnóstico, terapêutica, descarte de leite e morte de animais; e indiretas, associadas às perdas pela diminuição da produção durante a lactação atual, problemas reprodutivos e descarte prematuro dos animais (Rollin et al., 2015). Além disso, devido à presença de bactérias patogênicas no leite e da capacidade de algumas delas produzirem toxinas, a mastite é um potencial problema de saúde pública (Wilson & Gonzalez, 2003).

De acordo com a sua epidemiologia, a mastite pode ser classificada como contagiosa ou ambiental (Abebe et al., 2016). Na primeira, o úbere infectado apresenta-se como reservatório primário, enquanto que a forma ambiental, o ambiente contaminado é o principal local de transmissão dos patógenos (Cervinkova et al., 2013).

Dentre os agentes causadores de mastite contagiosa, destaca-se o *Mycoplasma* spp., um patógeno emergente, que causa graves quadros de mastite clínica (Royster & Wagner, 2015). Pertence à classe *Mollicutes*, composta por bactérias desprovidas de parede celular, resistente aos betalactâmicos e, conseqüentemente, refratários aos principais tratamentos da enfermidade (Gonzalez & Wilson, 2003; Caswell & Archambault, 2007; Fox, 2012;). O diagnóstico laboratorial deste agente, através de cultura bacteriológica de suabes ou líquidos biológicos, é lento e laborioso (Wawegama et al., 2016; Petersen et al., 2018). Neste sentido, a PCR surge como um recurso diagnóstico importante, com elevados índices de sensibilidade e especificidade, contribuindo para a rápida elucidação de casos de mastite por *Mycoplasma* (Wisselink et al., 2019).

Cabe ressaltar que são escassas as pesquisas sobre essa bactéria no Brasil. Dados divulgados na literatura se limitam a estudos realizados no estado do Paraná e de São Paulo (Mettifogo et al., 1996; Pretto et al., 2001, Francheschini et al., 2006; Manzi, 2018). Com isso, verifica-se a necessidade da realização de estudos adicionais para avaliar a prevalência

do agente nos rebanhos leiteiros das diferentes regiões do país, especialmente no Estado de Santa Catarina, que constitui uma das principais bacias leiteiras nacionais.

Com base no exposto, o presente estudo objetiva realizar a detecção molecular de bactérias da classe *Mollicutes* e do gênero *Mycoplasma*, através de PCR, utilizando amostras de leite bovino colhidas de casos de mastite, provenientes do estado de Santa Catarina e que apresentaram ausência de crescimento no exame microbiológico convencional.

### **3.2 Materiais e Métodos**

#### **3.2.1 Local e amostras**

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Veterinária do Instituto Federal Catarinense (IFC), *campus* Concórdia – SC. Foram utilizadas amostras por conveniência, de leite de vacas que apresentam suspeita de mastite clínica ou subclínica, provenientes de propriedades leiteiras do estado de Santa Catarina, encaminhadas para análise microbiológica neste mesmo laboratório.

Foram coletados um total de 187 amostras de leite de casos clínicos e subclínicos de mastite, que apresentaram ausência de crescimento no isolamento bacteriológico convencional, no período de agosto de 2017 a junho de 2018. As mesmas foram congeladas em duplicatas a -80 °C, para posterior extração de DNA bacteriano e detecção molecular. Ressalta-se que a presente proposta foi previamente submetida à avaliação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), a qual ficou dispensada de registro conforme parecer nº 33/2017.

#### **3.2.2 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada pelo método fenol-clorofórmio, seguindo metodologia previamente descrita por De et al. (2011). Inicialmente, 1 mL da amostra de leite foi centrifugada (6.700 x g/ 2min), a gordura removida com o auxílio de suabe estéril e o sobrenadante descartado. Ao sedimento, adicionou-se 500 µL de NaCl 0,9%, homogeneizou-se por 30 segundos, centrifugou-se (6.700 x g/ 2 min) e o sobrenadante foi

descartado. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de tampão de digestão [10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA; 100 mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mg/mL proteinase K], homogeneizou-se por 30 segundos e incubou-se a 50 °C/ 3 h. Em seguida, foram adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio (1:1), homogeneizado por 30 segundos e centrifugado (12.000 × g/ 2 min). A fase aquosa foi coletada e o passo anterior repetido com 500 µL de clorofórmio. À fase aquosa resultante adicionou-se 50 µL de acetato de sódio (3 M, pH 5.3) e 400 µL de isopropanol. As amostras foram misturadas por inversão, incubadas *overnight* a -20°C, centrifugadas (13.000 × g/ 10 min) e o sobrenadante descartado. O *pellet* resultante foi seco à temperatura ambiente, ressuscitado em 25 µL de água ultrapura e armazenado a -20 °C.

Posteriormente a extração do DNA, as amostras foram analisadas em nano-espectrofotômetro (Marca Biochrom, modelo Biodrop µLite) e em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio (0,025µL/mL). A pureza (260 nm/ 280 nm) e a concentração (ng/µL) total de DNA foram determinadas pelos valores densidade óptica obtidos em espectrofotômetro e a integridade do DNA foi visualizada no gel de agarose. Após, as amostras foram diluídas de modo a obter-se uma concentração de 100 ng/µL de DNA.

### 3.2.3 Reação em Cadeia de Polimerase

Para a detecção molecular da classe *Mollicutes*, foram utilizados os oligonucleotídeos MGSO (TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC) e GPO-3 (GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC), que amplificam um produto de 271 pares de base, tendo como DNA-alvo as regiões codificadoras do rRNA 16S e 23S (Van Kuppeveld et al. 1992). As reações de PCR foram realizadas em volume total de 25 µL, contendo 1 X tampão de reação, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 10 pmol de cada primer, 1,5 U de HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne) e 100 ng de DNA/reação. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Bio-Rad T-100), sob as seguintes condições: 95 °C/ 15 min, seguidos de 35 ciclos de 95 °C/ 30 seg, 55 °C/ 30 seg e 72 °C/ 30 seg; e um ciclo de extensão final a 72 °C/ 10 min.

As amostras positivas para a classe *Mollicutes*, foram submetidas a uma nova PCR gênero-específica para a amplificação do gênero *Mycoplasma*, utilizou-se nessa reação os *primers* F1 (ACA CCA TGG GAG YTG GTA AT) e R2 (GCA TCC ACC AWA WAC YCT T) (Harasawa,

1996). As reações de PCR foram realizadas com um volume total de 25 µL contendo 1X tampão de reação, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 10 pmol de cada primer, 1,5 U de HOT FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne) e 100 ng de DNA. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Bio-Rad T-100), sob as seguintes condições: 95 °C/ 15 min, seguidos de 35 ciclos de 95 °C/ 30 seg, 50 °C/ 30 seg e 72 °C/ 30 seg, e um ciclo de extensão final a 72 °C/ 10 min.

A visualização do material amplificado foi avaliada pela eletroforese, em gel de agarose a 1,5%, acrescido de brometo de etídeo (0,025µL/mL). Foram pipetados 5 µL da amostra e 1 µL do tampão de corrida (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 30% glicerol) para cada orifício do gel. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal, contendo TAE 1X ( 40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA), a 65 V/ 1 h. Após o término da corrida, o gel foi visualizado em transluminador sob luz UV e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital.

#### 3.2.4 Clonagem gênica e extração do DNA plasmidial

Os amplicons obtidos na PCR gênero-específica foram submetidos à clonagem, utilizado o *Kit CloneJET PCR Cloning* (Thermo Scientific), conforme instruções do fabricante. Para a transformação foram utilizadas células competentes de *E. coli*, linhagem DH5α, preparadas pela técnica de cloreto de cálcio (Sambrook & Russell, 2001). As colônias obtidas foram triadas para o inserto utilizando os oligonucleotídeos e as condições descritas no *kit* de clonagem. Após confirmação dos clones positivos por PCR, o plasmídeo recombinante foi extraído utilizando-se o *kit GeneJET Plasmid Miniprep* (Thermo Scientific), seguindo-se digestão enzimática com *Bgl*II para comprovação da presença do inserto.

#### 3.2.5 Sequenciamento e análise de similaridade

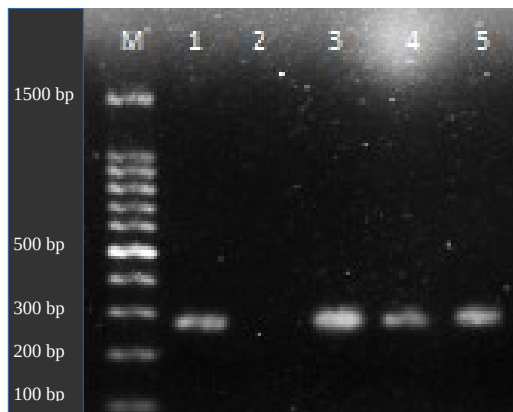
As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. Para as reações de sequenciamento foram utilizadas 100 ng do plasmídeo purificado e 10 pmol do oligonucleotídeo pJET1.2 F (CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GCA) ou pJET1.2 R (AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG). As

sequências obtidas foram submetidas a pesquisa de homologia usando o BLASTn (Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997).

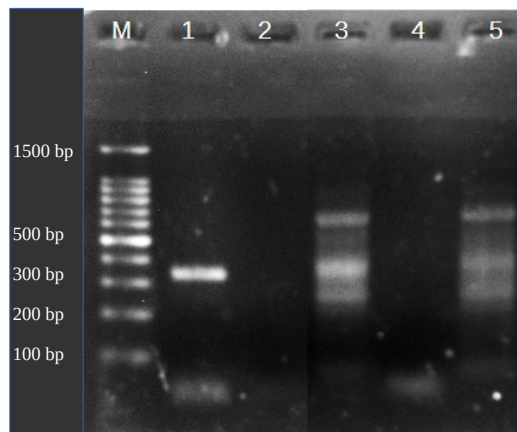
### 3.3 Resultados

Das 187 amostras testadas para *Mollicutes*, três (1,6%) apresentaram amplificação para esta classe (Figura 1). Ao realizar a PCR gênero-específico verificou-se que destas, duas amostras (1,1 %) apresentaram amplificação com produção de três e quatro bandas (Figura 2).

Na análise das sequências genéticas, dos clones recombinantes contendo os produtos da PCR gênero-específica, não se verificou homologia significativa com sequências genéticas de *Mycoplasma*, indicando que a amplificação detectada na eletroforese foi inespecífica.



**Figura 1. Eletroforese da PCR para *Mollicutes* em gel de agarose 1,5%.** M: Marcador de peso molecular 100 bp; 1: Controle Positivo; 2: Controle Negativo; 3-5: Amostras positivas.



**Figura 2. Eletroforese da PCR para *Mycoplasma* spp. em gel de agarose 1,5%.** M: Marcador de peso molecular 100 bp; 1: Controle Positivo; 2: Controle Negativo; 3 e 5: Amostras apresentando amplificação; 4: Amostra negativa.

### 3.4 Discussão

Dentre as espécies existentes de *Mycoplasma*, *M. bovis* é a mais prevalente e de maior importância clínica nos casos de mastite (Gonzalez & Wilson, 2003; Maunsell et al., 2011; Fox, 2012). Entretanto, outras espécies do gênero *Mycoplasma* e *Acholeplasma* foram relatadas com agentes causadores da enfermidade (Gonzalez & Wilson, 2003; Lysnyansky & Ayling, 2016).

Bactérias do gênero *Acholeplasma* geram controvérsias a respeito da sua patogenicidade. Enquanto alguns estudos sugerem que este micro-organismo pode ser um contaminante isolado do leite, outros relatam o seu envolvimento em surtos de mastite (Counter, 1978; Jasper, 1981; Boonyayatra et al., 2011).

A ausência da detecção de amostras positivas para o gênero *Mycoplasma*, a qual foi posteriormente comprovada pelos dados de sequenciamento, demonstram que este patógeno apresenta pouca relevância com casos de mastite na região estudada. Entretanto, devido à grande infecciosidade e reduzida probabilidade de tratamento, o diagnóstico precoce deste patógeno é essencial para evitar a sua disseminação no rebanho (Caswell & Archambault, 2007).

Bactérias deste gênero são altamente contagiosas, pouco responsivas aos tratamentos antimicrobiano convencionais (Owens & Nipper, 2008; Lysnyansky & Ayling, 2016). Com isso, revela-se a necessidade do diagnóstico, pois o controle estratégico desta bactéria baseia-se na segregação e descarte de animais infectados, evidenciando-se a necessidade de sua detecção para evitar surtos de mastite por este patógeno (Higuchi et al., 2011; Timonen et al., 2017).

Pesquisas realizadas na região meio-oeste do estado de São Paulo, mostraram que todas as amostras testadas foram negativas para *Mycoplasma* spp. (Francheschini et al., 2006). Entretanto, em outro estudo realizado na região central deste estado, verificou a prevalência de 16,4% para a classe *Mollicutes* e de 1,4% para a espécie *M. bovis* (Manzi et al., 2018).

Entre os fatores de risco relacionados à presença de *Mycoplasma* spp., destaca-se o tamanho do rebanho, no qual rebanhos maiores estão associados com a maior probabilidade de presença deste patógeno (Nicholas et al., 2016). Este fato pode explicar a



ausência desta bactéria no presente estudo, pois a maioria das amostras analisadas provém de pequenas propriedades leiteiras.

### **3.5 Conclusão**

A detecção de bactérias da classe *Mollicutes* em amostras de leite bovino obtidas de casos mastite em rebanhos leiteiros de Santa Catarina reforçam a necessidade de monitoramento epidemiológico constante nos plantéis. Para tanto, são necessárias técnicas diagnósticas de elevada acurácia, como a biologia molecular, uma vez que os métodos de cultivo microbiológico convencional podem determinar subdiagnóstico de infecções causadas por estes agentes.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo foi possível verificar a presença de *Mollicutes* em rebanho leiteiro do estado de Santa Catarina, alertando para o risco de transmissão deste micro-organismo entre os animais. Apesar da reduzida prevalência de amostras positivas, os resultados obtidos apresentam especial importância, considerando a elevada contagiosidade destes agentes e a reduzida eficácia terapêutica.

Com efeito, ressalta-se a necessidade de inclusão, na rotina laboratorial, de técnicas acuradas para a pesquisa destes agentes, uma vez que os mesmos não são identificados no cultivo bacteriológico convencional, caracterizando subdiagnóstico.

Sugere-se, portanto, a realização de estudos subsequentes para avaliar a prevalência de *Mycoplasma* spp. nos rebanhos leiteiros no Estado de Santa Catarina, de forma a atualizar os dados epidemiológicos regionais e contribuir para a identificação dos animais infectados, auxiliando nas medidas de profilaxia e controle a campo.

## 5 REFERÊNCIAS

ABEBE, R.; HATIYA, H.; ABERA, M.; MEGERSA, B.; ASMARE, K. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 270, 2016.

ALBUQUERQUE, P.; RIBEIRO, N.; ALMEIDA, A.; PANSCHIN, I.; PORFIRIO A.; VALES, M.; DINIZ, F.; MADEIRA, H.; TAVARES, F. Application of a dot blot hybridization platform to assess *Streptococcus uberis* population structure in dairy herds. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–11, 2017.

ALTSCHUL, F.; GISH, M.E.; MYERS, M.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN, DJ. Gapped BLAST and Psi-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n.1, p. 3389-3402, 1997.

APHIS-USDA. United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service. **Prevalence of contagious mastitis pathogens on U.S. dairy operations, 2007**: APHIS Info Sheet. 2008. Disponível em <[https://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07\\_is\\_ContMastitis.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_ContMastitis.pdf)> Acesso em 02 abr 2019.

ARCANGIOLI, M.A.; ASLAN, H.; TARDY, F.; POUMARAT, F.; LE GRAND, D. The use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Mycoplasma bovis* in French calf feedlots. **The Veterinary Journal**, v.192, p.96-100, 2012.

BARBERIO, A.; FLAMINIO, B.; VliegHER, S.; SUPRÉ, K.; KROMKER, V.; GARBARINO, C.; ARRIGONI, N.; ZANARDI, G.; BERTOCCHI, L.; GOBBO, F7.; CATANIA, S.; MORONI, P. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates identified in milk from dairy cattle in Belgium, Germany, and Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6578–6584, 2016.

BOONYAYATRA, S.; FOX, L.K.; GAY, J.M.; SAWANT, A.; BESSER, T.E. Discrimination between *Mycoplasma* and *Acholeplasma* species of bovine origin using digitonin disc diffusion assay, nisin disc diffusion assay, and conventional polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n.1, p. 7–13, 2011.

BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1368-1375, 2007.

CAMERON, M.; SAAB, M.; HEIDER, L.; MCCLURE, J.T.; RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C.; SANCHEZ, J. Antimicrobial Susceptibility Patterns of Environmental Streptococci Recovered from Bovine Milk Samples in the Maritime Provinces of Canada. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, n.79, 2016.

CASWELL, J.L.; ARCHAMBAULT, M. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. **Animal Health Research Reviews**, v. 8, p.161–186, 2007.

CERVINKOVA, D.; VLKOVA, H.; BORODACOVA, I.; MAKOVCOVA, J.; BABAK, V.; LORENCOVA, A.; VRTKOVA, I.; MAROSEVIC, D.; JAGLIC, Z. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. **Veterinarni Medicina**, v. 58, n. 11, p. 567–75, 2013.

COUNTER, D.E. A severe outbreak of bovine mastitis associated with *Mycoplasma bovigentialium* and *Acholeplasma laidlawii*. **Veterinary Record**, v. 103, p. 130, 1978.

DE, S.; BRAHMA, B.; POLLEY, S.; MUKHERJEE, A.; BANERJEE, D.; GOHAINA, M.; SINGH, K. P.; SINGH, R.; DATTA, T.K.; GOSWAMI, S.L. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. **Food Control**, v.22, n.5, p. 690–696, 2011

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **ANUÁRIO leite 2018**: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. 2018. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>> Acesso em 03 mar 2019;

FILIOUSSIS, G.; CHRISTODOULOPOULOS, G.; THATCHER, A.; PETRIDOU, V.; BOURTZI-CHATZOPOULOU, E. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. **The Veterinary Journal**, v.173, n.1, p. 215-218, 2007.

FOX, L. K. *Mycoplasma* Mastitis. Causes, Transmission, and Control. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 225–237, 2012.

FRANCHESCHINI, V.M.; NOGUEIRA, M.F.; VICTÓRIA, C.; SILVA, R.C.; LANGONI, H. Research for *Mycoplasma* spp. in milk samples from mastitic cows. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v. 22, n. 2, p. 130-134, 2006

GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p.199–221, 2003.

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

HARASAWA, R. Application of nested PCR to detection of mycoplasmas. **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology**, v. II, p. 75-79, 1996.

HIGUCHI, H.; IWANO, H.; KAWAI, K.; OHTA, T.; OBAYASHI, T.; HIROSE, K.; ITO, N.; YOKOTA, H.; TAMURA, Y.; NAGAHATA, H. A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 191–194, 2011.

JASPER, D.E. Bovine mycoplasmal mastitis. **Advances in veterinary science and comparative medicine**, v. 25, p. 121–157, 1981.

JOHNZON, C.F.; ARTURSSON, K.; SÖDERLUND, R.; GUSS, B., RÖNNBERG, E.; PEJLER, G. Mastitis pathogens with high virulence in a mouse model produce a distinct cytokine profile in vivo. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. SEP, p. 1–11, 2016.

JUNQUEIRA, N.B.; LANGONI, H. Aspectos gerais sobre a mastite bovina causada por *Mycoplasma* spp. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 3. 2016.

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G.C.; JUNQUEIRA, N.B.; MENOZZI, B.D.; JOAQUIM, S.F. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017.

LYSNYANSKY, I.; AYLING, R.D. *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 665–669, 2018.

MAUNSELL, F.P.; WOOLUMS, A.R.; FRANCOZ, D.; ROSENBUSCH, R.F.; STEP, D.L.; WILSON, D.J.; JANZEN, E.D. *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 772–783, 2011.

MCAULIFFE, L.; ELLIS, R.J.; MILES, K.; AYLING, R.D.; NICHOLAS, R.A.J. Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. **Microbiology**, v.152, n. 4, p. 913–922, 2006.

MCDONALD, W.L.; RAWDON, T.G.; FITZMAURICE, J.; BOLOTOVSKI, I.; , VOGES, H.; HUMPHREY, S.; FERNANDO, K.; CANAGASEBEY, Y.; THORNTON, R.N.; MCINTYRE, L. Survey of bulk tank milk in New Zealand for *Mycoplasma bovis*, using species-specific nested PCR and culture, **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 1, p. 44-49, 2009.

METTIFOGO, E.; NASCIMENTO, E.R.; MÜLLER, E.E.; NASCIMENTO, M.G. F.; FREITAS, J.C. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 22-25. 1996.

MURAI, K.; HIGUCHI, H. Prevalence and risk factors of *Mycoplasma bovis* infection in dairy farms in northern Japan. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 29–31, 2019.

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

OULTRAM, J.W.H.; GANDA, E.K.; BOULDING, S.C.; BICALHO, R.C.; OIKONOMOU, G. A Metataxonomic Approach Could Be Considered for Cattle Clinical Mastitis Diagnostics. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, n. March, p. 36, 2017.

OWENS, W.E.; NIPPER, W.A. Development of a *Mycoplasma Mastitis* Control Program in Louisiana. **The Professional Animal Scientist**, v. 24, n.1, p. 103–106, 2008.

PARKER, A.M.; HOUSE, J.K.; HAZELTON, M.S.; BOSWARD, K.L.; SHEEHY, P.A. Comparison of culture and a multiplex probe PCR for identifying *Mycoplasma* species in bovine milk, semen and swab samples. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–14, 2017.

PASSCHYN, P.; PIEPERS, S.; MEULEMEESTER, L. et al. Research in veterinary science between herd prevalence of *Mycoplasma bovis* in bulk milk in Flanders, Belgium. **Research in Veterinary Science**, v.92, p. 219-220, 2012.

PERES, N.F.; ZAPPA V. Mastite em vacas leiteiras-revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.16, p.1-28, 2011.

PETERSEN, M.B.; PEDERSEN, J.; HOLM, D.L.; DENWOOD, M.; NIELSEN, L.R. A longitudinal observational study of the dynamics of *Mycoplasma bovis* antibodies in naturally exposed and diseased dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 7383–7396, 2018.

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

RADAELLI, E.; CASTIGLIONI, V.; LOSA, M.; BENEDETTI, V.; PICCININI, R.; NICHOLAS, R.A.J.; SCANZIANI E.; LUINI, M. Outbreak of bovine clinical mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in a North Italian herd. **Research in Veterinary Science**, v.91, n.2, p.251–253, 2011.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.4, p.1094–1156, 1998.

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K.C.; OVERTON, M.W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 122, n. 3, p. 257–264, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, vol. 1, 2 e 3. 3ª ed. Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, p. 2100. 2001.

TIMONEN, A.A.E.; KATHOLM, J.; PETERSEN, A.; MÖTUS, K.; KALMUS, P. Within-herd prevalence of intramammary infection caused by *Mycoplasma bovis* and associations between cow udder health, milk yield, and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n.

8, p. 6554–6561, 2017.

VAN KUPPEVELD, F.J.M.; VAN DER LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F. et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2606-2615, 1992.

WAWEGAMA, N.K.; BROWNING, G.F. Improvements in diagnosis of disease caused by *Mycoplasma bovis* in cattle. **Animal Production Science**, v. 57, n. 7, p. 1482, 2017.

WISSELINK, H.J.; SMID, B.; PLATER, J.; RIDLEY, A.; ANDERSSON, A.M.; ASPÁN, A.; POHJANVIRTA, T.; VÄHÄNIKKILÄ, N.; LARSEN, H.; HØGBERG, J.; COLIN, A.; TARDY, F. A European interlaboratory trial to evaluate the performance of different PCR methods for *Mycoplasma bovis* diagnosis. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 8, 2019.

## ANEXO

### ANEXO A- Parecer do CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE – CAMPUS CONCÓRDIA

Rod. SC 283 km 08 – Vila Fragosos – Concórdia – SC - CEP 89700-000 – Fone: (49) 3441-4800 – Fax: (49) 3441-4834  
E-mail: ifc@ifc-concordia.edu.br

Concórdia, 08 de Dezembro de 2017.

#### PARECER SUBSTANCIADO

Protocolo CEUA/IFC Câmpus Concórdia nº: 33/2017

**TÍTULO:** Detecção molecular de *Mycoplasma bovis* em amostras de leite bovino mastítico com ausência de crescimento no isolamento microbiológico

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Diogenes Dezen

**INSTITUIÇÃO/UNIDADE:** IFC – *Campus* Concórdia

**PARECER:** Devido às amostras serem provenientes de rotina diagnóstica microbiológica, a proposta fica dispensada do registro neste comitê.

Informo ainda, que o projeto deverá sofrer as readequações supracitadas e reenviado a este comitê, no prazo de 60 (sessenta) dias, sob pena de reprovação.

Sem mais para o momento, aguardo o retorno, em até 60 (sessenta) dias, das alterações propostas por este comitê.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lucio Pereira Rauber', written over a horizontal line.

Lucio Pereira Rauber  
Vice-Coordenador CEUA – IFC Câmpus Concórdia  
Portaria nº 4069/2016  
e-mail: ceua@ifc-concordia.edu.br

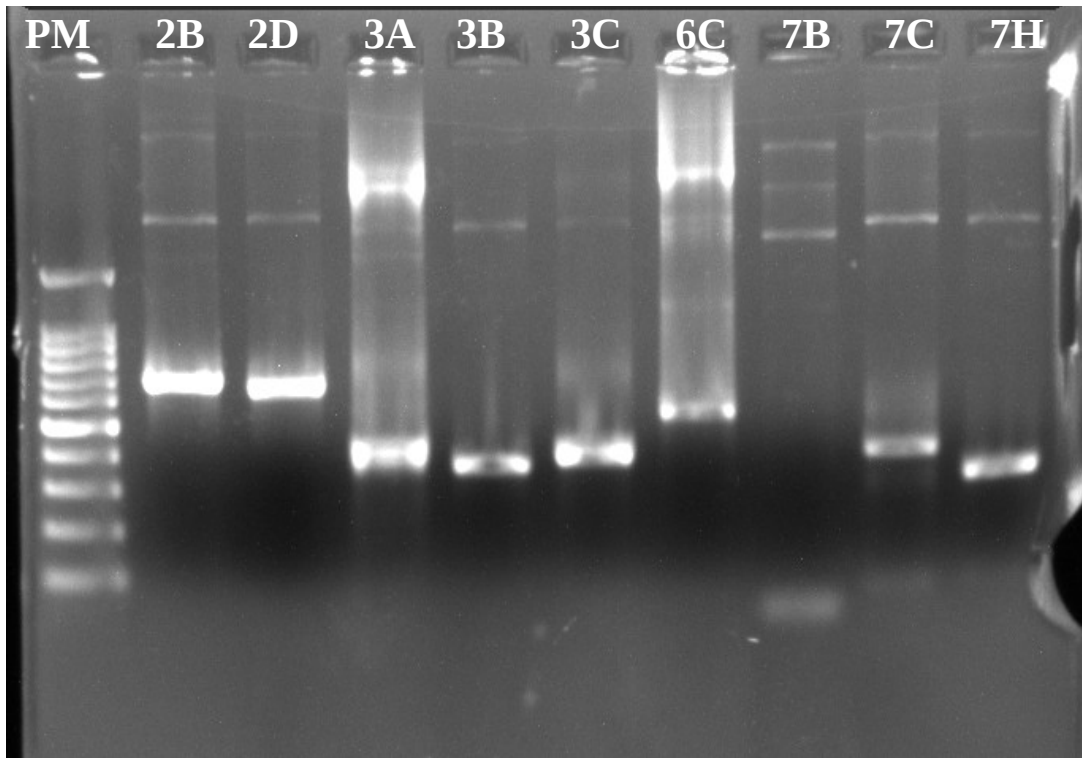


## APÊNDICE

### APÊNDICE A- Tabela da quantificação de DNA (ng/ul) em Biodrop

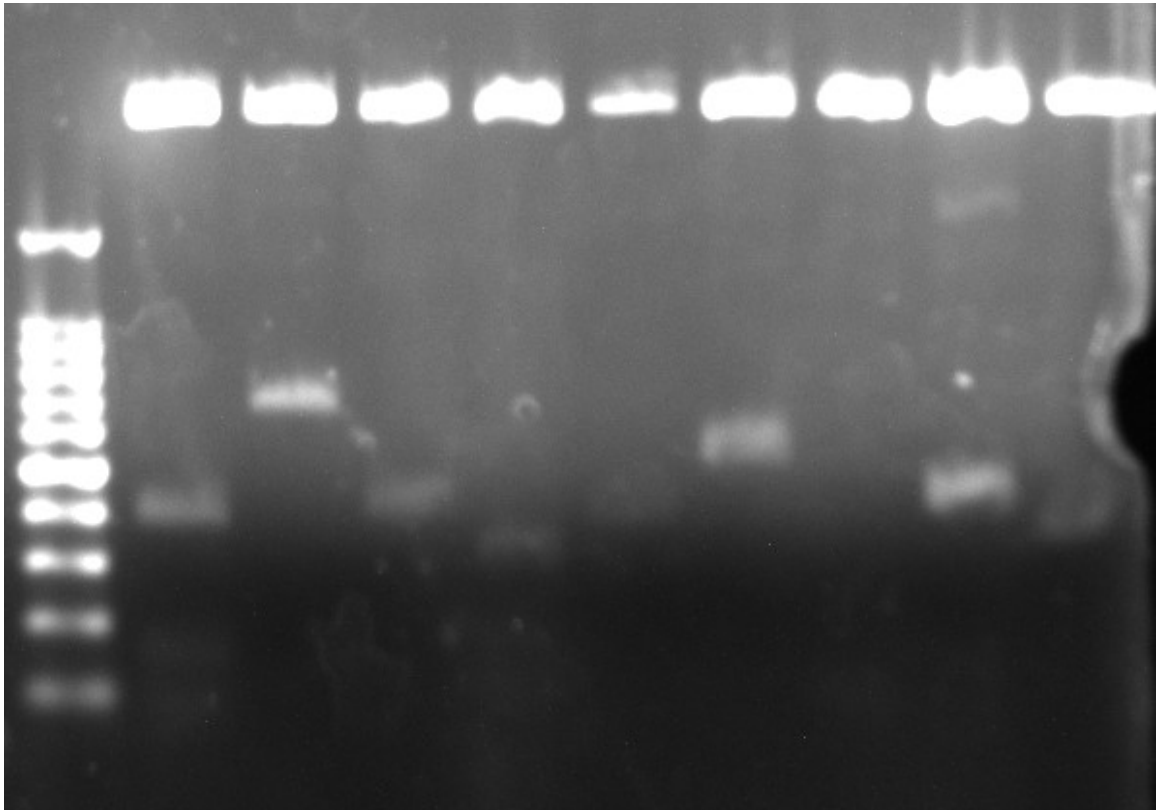
Amostra ID	RG	Conc. DNA (ng/ul)	Amostra ID	RG	Conc. DNA (ng/ul)	Amostra ID	RG	Conc. DNA (ng/ul)
2	127/17 04	314	72	287/17 21	180	141	128/18 1	159
3	128/17 09	222	73	287/17 22	232	142	128/18 3	141
4	128/17 10	267	74	287/17 23	170	143	127/18 4	231
5	128/17 14	197	75	287/17 28	205	144	136/18 3	143
6	138/17 1	494	76	288/17 01	226	145	133/18 3	132
7	138/17 2	702	77	288/17 03	224	146	133/18 9	126
11	138/17 6	228	78	288/17 04	163	147	133/18 13	187
12	138/17 7	369	79	301/17 01	252	148	133/18 14	142
13	138/17 8	345	80	301/17 05	236	149	133/18 29	130
14	147/17 7	346	81	301/17 06	204	150	147/18 2	136
15	147/17 10	213	82	301/17 10	189	151	150/18 2	136
16	147/17 11	126	83	301/17 11	185	152	145/18 2	381
17	188/17 1	226	84	338/17 4	125	153	145/18 10	492
18	188/17 3	188	85	338/17 5	171	154	145/18 15	125
19	189/17 1	218	86	338/17 6	85	155	145/18 19	121
21	203/17 1	275	87	333/17 2	151	156	157/18 3	206
22	203/17 2	188	88	343/17 8	163	157	157/18 6	166
23	203/17 4	175	89	399/17 1	166	158	157/18 17	189
24	203/17 5	141	91	399/17 4	153	159	172/18 1	190
26	203/17 7	182	92	395/17 2	178	160	172/18 2	182
27	203/17 9	195	93	404/17	139	161	172/183	694
28	203/17 12	139	94	406/17 3	175	162	172/18 4	252
29	203/17 13	163	95	413/17 8	127	163	172/18 4	154
31	203/17 17	187	96	415/17	77	164	173/18 1	130
32	203/17 20	151	97	418/17 7	164	165	174/18 7	146
33	203/17 23	126	98	422/17 2	164	166	178/18 2	114
34	203/17 24	15	99	424/17 1	168	167	178/18 3	100
35	203/17 31	140	100	424/17 2	200	168	178/18 5	75
36	208/17 3	191	101	10/18 6	172	169	179/18 2	68
37	208/17 4	222	102	02/18 1	86	170	179/18 11	93
38	208/17 5	233	103	02/18 3	191	171	179/18 20	120
39	210/17 1	273	104	02/18 6	2334	172	182/18 1	112
40	210/17 2	283	105	13/18 2	132	173	194/18 1	72
41	210/17 3	2367	106	13/18 9	73	174	194/18 2	177
42	210/17 4	246	107	13/18 14	183	175	194/18 3	99
43	233/17 6	204	108	13/18 15	140	176	194/18 5	117
44	233/17 7	213	109	15/18 01	159	177	194/18 14	107
45	233/17 10	171	110	15/18 5	136	181	248/18 6	92
46	233/17 11	218	111	15/18 6	121	182	248/18 7	106
47	233/17 16	203	112	15/18 10	158	184	251/18 2	167
49	229/17 1	198	113	17/18 2	189	185	251/18 3	148
50	229/19 3	173	114	17/18 4	203	186	252/18 4	148
51	229/17 6	252	116	25/18 2	153	187	252/18 5	128
52	228/17 6	190	117	25/18 11	170	188	259/18 4	152
53	228/17 9	270	118	25/18 12	135	189	225/18 6	148
54	228/17 13	235	119	25/18 15	171	190	225/18 7	185
55	228/17 14	189	120	69/18 4	217	191	225/18 9	203
56	228/17 15	215	121	69/18 6	174	192	225/18 17	156
57	248/17 01	232	122	69/18 22	225	193	225/18 19	165
58	248/17 02	206	123	69/18 23	159	194	237/18 3	209
59	248/17 03	162	124	69/18 27	158	195	237/18 4	180
60	244/17 01	259	127	81/18 1	155	196	239/18 2	192
61	255/17 02	236	128	83/18 1	403	197	239/18 4	166
62	255/17 03	193	130	89/18 4	93	198	198/18 1	200
63	255/17 05	208	131	89/18 6	145	199	198/18 4	81
64	273/17 05	249	132	89/18 12	148	200	201/18 1	186
65	283/17 02	201	133	89/18 18	103	201	201/18 3	174
66	283/17 03	224	134	89/18 21	132	202	201/18 4	132
68	287/17 27	216	135	89/18 25	145	203	203/18 2	119
69	287/17 6	179	136	89/18 27	124	204	203/18 5	145
70	287/17 7	176	138	97/18 4	133	205	207/18 1	108
71	287/17 16	219	139	124/18 2	141	206	207/18 2	146

**APÊNDICE B- Detecção dos clones recombinantes**



APÊNDICE C- Foto do gel com digestão da *Bgl*II

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



**Legenda:** Eletroforese da clivagem com *Bgl*II em gel de agarose 1,5%. M: Marcador de peso molecular 100 bp; 1 a 9: Amostras clivadas

**APÊNDICE D – Sequências de nucleotídeos obtidas dos fragmentos de DNA obtidos na amplificação da PCR gênero específica.**

Os nucleotídeos em negrito indicam a sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação.

> Fragmento-2 (653 bp)

**ACACCATGGGAGTTGGTAAT**GGACAGGGAGGCCTGGCGTGCTGTGATTCATGGGGTCGCAAAGAG  
TCAGACACGACTGAGCGACTGATCTGATCTGAATGGAGTTTCCTTTGAGAATTCCTATAGTTCTCTG  
AAAGTAAGCCTAAAAAAGGTCCCAAACCTTTGTCTTCATGTCACTCATATTAAGTATTGTATTTAAA  
ATAAACTTACTCCTTGAAGGAAAGTTATGACCAAACCTAGGCAGCATATTAAGCAGAGACATTA  
CTTTGTCAACAAAGGTCCGTCTAGTCAAGGCTATGGTTTTTCCAATGGTCATGTATGGATGTGAGAGT  
TGGACTGTAAAGAAAGCTGAGCGCCAAAGAATTGATGCTTTTGAAGTATGGTGTGCAGAAGACTCT  
TGAGAGTCCCTTGGACGGCAAGGAGATCCAACAGTCCATCCTAAAGGAAATCAGTCTGGTCGTTT  
ATTGTTAGGACTGATGTTGAAGCTGAACTCCAATTCCTTTGGCCACCTGATGTGAAGAGCTGACTCAT  
TTGCAAAGACCCTTATGCTGGGAAAGATTGAGGGCAGGGGGAGAAGGGGACGACAGAGGATGAG  
ATGGTTGGATGGAATCAACTATTCGATAGACA**AAGGGTTTTTGGTGGATGC**

> Fragmento-3 (372 bp)

**ACACCATGGGAGTTGGTAAT**GGACAGGGAAGCCTGGCATGCTGCAGTCCATGGGGTCTGCAAATAT  
TCAGACACGACTGAGCTGAACTGAATTGAACTTAACTCTGAAATGTTGTGTGCAGAACTCGGA  
AGCTAGGAGAGATTATTTCCAGTTTTTCCGTAATCGAAGTGTGACCAATCCTAGAGTTCCCACCATTG  
GATAAGTTAAAGGATCAGGCACATGAAATTACCAATTGAAGAAGGTGAGAGTATGACTCTCAAAGG  
ACTAGTGACCAATTCATGATAATGTGAtNaNNNNaNNNgNNNtgnNNNnNNNNNNNNNTNtTNGAGA  
CATGACAGGAGAGTATATTT**AAGGGTTTATGGTGGATGC**

> Fragmento-6 (511 bp)

**ACACCATGGGAGTTGGTAAT**TTGTTGCCCTTCATACTTGTATAACACATCACTCTGGTTGCTGAGT  
GGAAGCTGACCATATTAGGAAAGGATGGAAGACAAAAGTAGTTAGGGGAACTATTGCACTAGTCAA  
GGTGAAGATGATAGTGGTGTAAAGGAAGATGGTCATGATAGGGGTAGTGAAAACATCAATCTTAG  
GAGATGATTTGAAGGTGAGGGTAAACTACTTGCTGAGGAATTGGATATTATCTCTGAAGGAAGAA  
GAGGAATGTGGGGCAATGAAGTAAATGGGATCTATAGATGGAAGAACAGATTTTGAGATGGGAAA  
TTAAGAGTCTCTTTAGACATGCTATGTTGAGATGTCTTTTAAATGTATGAAACAAAATGTCAAGTA  
ATTAGATGGCTATACAAATTGAAGTTCAGAGAAGTGATCTGAATCAGACATGAGTCTGCTACTTAAA  
TGGGGTTGGAGATTTATATCTGGAA**ATTACCAGCTCCCATGGTGT**

> Fragmento-7N (369 bp)

**GCATCCACAAAACCCTT**ATGGCAGAAAGTGAAGAAGAAAGAAGAGCCTCTTGATGAAAGAAGAG  
AATGAAAGAGTTGGCTTAAAGCTCAACATTCAGAAAACCTAAGATCATGGTATCCAGTCCCATCACTTC  
ATGGGAAGTAGATGGGGAAACAGTGGAAACAGTGTCTGGCTTTATTTGGGGGGCTCCAAAATCAT  
TGCAAATGGTACTGCAGCCATGAAATTAAGATGCTTACTTCTTGAAGGAAAGTTTATGACCAA  
CCTAATTCATTCAGTTCAGTTGCTCAGTCATGTCCAACCTACTTGTGACCCCATGAACCGCAGCATGCC  
AGGCTTCCCTGCC**ATTACCAGCTCCCATGGTGT**

> Fragmento-7CeH (372 bp)

**ACACCATGGGAGTTGGTAAT**AAATTAADNABasNrAssNmbNNrdNmNvNrsNNnNNNrchasNNNc

NnsNtNrNmNvNthNsadCGCAAGGCGTATGGTACGCACTACGATACAAGGAGCACAGACATTGTGA  
CAAACATCGTTGGTCTGAAGGGGAAAAGAACAACCTTGTGTTAACACAAAAGAAAAATAAAAAGAACAG  
CTTTAGCTGACATAGGCATACCTGAAATGATAAACTGCAAGATTGACAGCTTTGGGGGGAAAATGG  
ACTTGC GGAAACCACCCTAGATTCGGAGCAAACATTTGCCAGATTTAAACACATAGGCTATCTAGAA  
CCGACTTAAGATGAATCACAAAGGGTATATGGTGGATGC