

MASTITE EM NOVILHA POR *Mycoplasma bovis*

PAULO EDUARDO PARDO¹
ERNST ECHEHARDT MÜLLER²
ELENA METTIFOGO²
JULIO CESAR DE FREITAS²
ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO³

PARDO, P.E., MULLER, E.E., METTIFOGO, E. FREITAS, J.C. de, NASCIMENTO, E.R. do. Mastite em novilha por *Mycoplasma bovis*. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.19, n.1, p.73-78, mar. 1998.

RESUMO: Neste trabalho, relata-se pela primeira vez no Brasil, o isolamento de *Mycoplasma bovis* em uma novilha apresentando mastite clínica. Os resultados bacteriológicos de rotina apresentaram-se negativos, enquanto que as colônias observadas no meio de Hayflick, caracterizadas por provas bioquímicas e pela imunofluorescência direta, foram identificadas como *M. bovis*.

PALAVRAS-CHAVE: Bovino, Novilha, Mastite, *Mycoplasma bovis*.

1. INTRODUÇÃO

Os micoplasmas formam um grupo de procariontes caracterizados pela ausência de parede celular e reduzido genoma, que os tornam extremamente exigentes em relação às condições de crescimento in vitro (Razin & Tully, 1983).

Várias espécies de micoplasmas são importantes agentes de pneumonia, artrite, distúrbios urogenitais e mastite nos bovinos. Nos últimos 35 anos, os relatos sobre o envolvimento dos micoplasmas nas mastites têm aumentado em vários países do mundo (Jasper, 1967; Gonzalez et al., 1992; Sachse et al., 1993; Poumarat et al., 1994). A suspeita de mastite por micoplasma deve ser considerada em rebanhos com histórico de resultados negativos nas culturas bacteriológicas padrões e refratariedade aos tratamentos (Cullor, 1993).

O *Mycoplasma bovis* foi a primeira espécie de micoplasma reconhecida como causadora de mastite bovina na Inglaterra (Davdson & Stuart, 1960). Posteriormente, este microrganismo também foi isolado no Canadá (CHO et al., 1976) e na Califórnia/ EUA (Jasper, 1982), causando surtos graves de mastite.

Normalmente a mastite por *M. bovis* apresenta-se com menor intensidade e persistência quando comparada à do *Mycoplasma bovis* provocando, eventualmente, infecções graves que levam à agalaxia e à involução dos quartos afetados (Jasper, 1987). Em 1978, Counter, na Inglaterra (citado por Jackson & Boughton, 1991), descreveu um surto de mastite por

M. bovis associado ao *Acholeplasma laidlawii*, que comprometeu 75 animais de um rebanho de 200 vacas. Outros casos, com sinais clínicos mais brandos foram registrados por Jackson & Boughton (1991), também na Inglaterra, onde o *M. bovis* foi isolado de amostras de leite de 16 vacas pertencentes a um rebanho de 99 animais. No Brasil, a única espécie de micoplasma relatada como causadora de mastite em bovinos de leite até o momento foi o *M. bovis* que determinou manifestações clínicas em vários animais de um rebanho da região de Londrina/PR (Mettifogo et al., 1996).

As espécies de micoplasma causadoras de mastite, incluindo o *M. bovis*, podem fazer parte da microbiota e são comumente encontradas em vacas sadias na superfície da mucosa nasal, faringe, trato urogenital, além das articulações e da glândula mamária. Situações de estresse como trauma, parto ou qualquer anormalidade nas funções fisiológicas do animal, são consideradas como fatores predisponentes para que estes organismos provoquem a doença (Bushnell, 1984). Os animais jovens são expostos aos micoplasmas pelo contato direto com o trato urogenital durante o parto, com descargas nasais da mãe ou pelo leite consumido de vacas que estejam eliminando estes microrganismos, exercendo o papel de reservatório assintomático de micoplasmas. Posteriormente, na fase adulta, esses animais podem apresentar problemas de infertilidade ou de mastite relacionados com o *M. bovis* (JACKSON & BOUGHTON, 1991).

¹ Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal/ DMVP/ CCA - Universidade Estadual de Londrina.

² Depto. de Medicina Veterinária Preventiva/ CCA - Universidade Estadual de Londrina. Cx. p. 6001, Londrina, PR, CEP 86051-990.

³ Depto. de Epidemiologia e Saúde Pública, IV, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ.

Órgãos Financiadores: CPG/UEL e CNPq.

O objetivo desta comunicação foi relatar pela primeira vez no Brasil, o isolamento de *M. bovis genitalium* como agente etiológico de mastite clínica em uma novilha nos períodos pré e pós-parto.

2. DESCRIÇÃO DO CASO

Em uma propriedade leiteira da região norte do Estado do Paraná, com um rebanho de 25 vacas em lactação da raça Holandesa Preto e Branco, uma novilha apresentou sinais clínicos de mastite aproximadamente 30 dias antes do parto. Inicialmente, foram comprometidos os quartos posteriores que apresentaram edema, hiperemia e aumento da sensibilidade, porém sem manifestação de sinais sistêmicos. A secreção destes quartos, apresentando coloração amarelada com sedimento e o sobrenadante aquoso, foi semeada em ágar sangue ovino 5% e ágar MacConkey. As placas foram incubadas a 37°C por 120 horas e não apresentaram crescimento. Em função deste resultado, nova colheita foi realizada 15 dias antes do parto e as amostras semeadas nos meios já citados, além do meio específico para micoplasma - Hayflick modificado, líquido e sólido, acrescido de 20% de soro equino, 0,02 mg/mL de DNA de timo de bezerro e 0,05 mg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de microaerofilia e observados diariamente com o auxílio de um microscópio estereoscópio. Nas placas de ágar sangue e MacConkey, novamente não houve crescimento. No meio de Hayflick, após 72 horas de incubação foram observadas colônias com a forma típica de "ovo-frito". Não foi verificada alteração na coloração do meio líquido de Hayflick, concluindo-se que a cepa foi negativa para a fermentação de glicose e para a hidrólise de arginina.

A seguir, foi realizada a clonagem de uma colônia para a realização dos testes de sensibilidade à digitonina e da imunofluorescência direta, utilizando-se conjugados para o *M. bovis Donetta*, *M. bovis genitalium* e *M. californicum*, espécies de micoplasmas causadoras de mastite em bovinos e também negativas nos testes da glicose e arginina. Anticorpos anti-espécies de micoplasmas, marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) provenientes do National Institute of Allergy & Infections Diseases, Bethesda, Maryland,

EUA, foram reconstituídos em PBS (pH 7,2) na proporção de 1:20 e 1:40 e o teste realizado segundo RAZIN & TULLY (1983). Para os controles positivos e negativos, foram utilizadas as cepas de referência das espécies citadas anteriormente, como cepas homólogas e heterólogas. A cepa isolada neste trabalho apresentou sensibilidade à digitonina e fluorescência positiva frente ao conjugado contra *M. bovis genitalium*.

Na primeira ordenha pós-parto e sete dias após foram colhidas amostras de leite dos quatro quartos e semeadas nos meios de cultura já citados. Neste período, o animal ainda mostrava os mesmos sinais clínicos apresentados no pré-parto com um aumento acentuado do edema. Nas amostras do primeiro dia após o parto foi confirmada a infecção por *M. bovis genitalium* nos quartos posteriores. Nas amostras do sétimo dia, o *M. bovis genitalium* foi isolado nos quatro quartos, mostrando que apesar da adoção de medidas especiais de higiene e manejo de ordenha, o agente disseminou-se para os outros quartos. O tratamento realizado na primeira semana pós-parto com aplicação de 1 g de tilosina/dia por via intramamária durante cinco dias e duas aplicações parenterais de oxitetraciclina (10 mg/Kg/p.v.) com intervalo de três dias, levou à atenuação dos sintomas, mas não à cura bacteriológica. Ao final do primeiro mês de lactação, o animal apresentou reação positiva no California Mastitis Test (CMT) e isolamento de *M. bovis genitalium* nos quatro quartos, demonstrando que não ocorreu a cura bacteriológica.

Paralelamente, na mesma propriedade, foram colhidas amostras de leite dos animais em lactação com mastite subclínica, detectada pelo CMT. Em nenhuma das amostras foi isolado o *M. bovis genitalium*.

3. CONCLUSÕES

Os resultados negativos obtidos pelas técnicas bacteriológicas de rotina utilizadas neste trabalho, somados ao isolamento e a identificação do *M. bovis genitalium* em sucessivas colheitas, permitem concluir que este patógeno foi o responsável pelo quadro clínico de mastite descrito. O tratamento utilizado, apesar de ter levado a uma atenuação dos sintomas, não propiciou a cura bacteriológica do animal.

PARDO, P.E., MULLER, E.E., METTIFOGO, E. et al. Heifer mastitis by *mycoplasma bovis genitalium*. *Semina: Ci. Agr., Londrina*, v.19, n.1, p.76-78, mar. 1998.

ABSTRACT: In this paper was report for the first time in Brazil the isolation of *Mycoplasma bovis genitalium* in a heifer with clinical mastitis. Negative results were obtained on standard bacteriology, but growth was observed on Hayflick medium. The colonies were characterized by biochemical and direct immunofluorescence, as *M. bovis genitalium*.

KEY WORDS: Bovine, Heifer, Mastitis, *Mycoplasma bovis genitalium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUSHNELL, R.B. Mycoplasma mastitis. *Vet. Clin. of North. Am. : Large AN. Pract.*, v.40, p.301-312, 1984.
- CHO, J.H., RUHNKE, H.L., LANGFORD, E.V. The indirect hemaglutinação test for the detection of antibodies in cattle naturally infected with mycoplasma. *Can. J. Comp. Med.*, v.40, p.20-29, 1976.
- CULLOR, J.S. The control, treatment, and prevention of the various types of bovine mastitis. *Vet. Med. Food-Animal Pract.*, v.35, p.571-579, 1993.
- DAVIDSON, I. & STUART, P. Isolation of a Mycoplasma-like organism from na outbreak of bovine mastitis (letter). *Vet. Rec.*, v.72, p.766, 1960.
- GONZALEZ, R.N., SEARS, P.M., MERRIL, R.A., HAYES, G.L. Mastitis due to mycoplasma in the State of New York during the period 1972-1990. *Cornell Vet.*, v.82, p.29-40, 1992.
- JACKSON, G. & BOUGHTON, E. A mild outbreak of bovine mastitis associated with *Mycoplasma bovigenitalium*. *Vet. Rec.*, v.16, p.444-446, 1991.
- JASPER, D.E. Mycoplasma: their role in bovine disease. *J. Am. Vet. Ass.*, v.151, p. 1650-1655, 1967.
- JASPER, D.E. The role of mycoplasma in bovine mastitis. *J. Am. Vet. Assoc.*, v.181, p.158-162, 1982.
- JASPER, D.E. Bovine mastitis due to mycoplasma. *Vet. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.6, p.801-807, 1987.
- METTIFOGO, E., NASCIMENTO, E.R., MÜLLER, E.E., NASCIMENTO, M.G.F., FREITAS, J.C. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.18, p.22-25, 1996.
- SACHSE, K., PFÜTZNER, H., HOTZEL, H., DEMUTH, B., HELLER, M., BERTHOLD, E. Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.*, v.12, p.571-580, 1993.
- POUMARAT, F., SOLSONA, M., BOLDINI, M. Genomic, protein and antigenic variability of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, v.40, p.305-321, 1994.
- RAZIN, S., TULLY, J.G. Mycoplasma characterization. In: METHODS in Mycoplasmaology. New York : Academic Press, 1983. v.1.