

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE

**IMUNOPEROXIDASE E MÉTODOS MOLECULARES NA
DETECÇÃO DE *Mycoplasma* spp. (MOLLICUTES:
MYCOPLASMATACEAE) EM CONDUTO AUDITIVO DE
BOVINOS E EM *Raillietia* spp. (GAMASIDA:RAILLIETIDAE)**

Sandra Batista dos Santos

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**IMUNOPEROXIDASE E MÉTODOS MOLECULARES NA DETECÇÃO
Mycoplasma spp. (MOLLICUTES: MYCOPLASMATACEAE) EM
CONDUTO AUDITIVO DE BOVINOS E EM *Raillietia* spp.
(GAMASIDA:RAILLIETIDAE)**

SANDRA BATISTA DOS SANTOS

Sob a Orientação do Professor
João Luiz Horácio Faccini

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Curso de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, Área de
Concentração em Parasitologia
Veterinária

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2009

636.2089699 Santos, Sandra Batista dos, 1978-
5
S237iT Imunoperoxidase e métodos moleculares na
detecção Mycoplasma spp. (Mollicutes:
Mycoplasmataceae) em conduto auditivo de bovinos e
em Raillietia spp. (Gamasida: Raillietidae) /
Sandra Batista dos Santos - 2009.
76f. : il.

Orientador: João Luiz Horácio Faccini.
Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 56-71

1. Bovino - Doenças - Teses. 2. Mycoplasma -
Teses. 3. Caprino - Doenças - Teses. 4.
Raillietia - Teses. 5. Parasitologia veterinária
- Teses. I. Faccini, João Luiz Horácio, 1947-.
II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

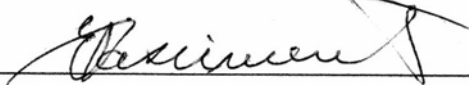
SANDRA BATISTA DOS SANTOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

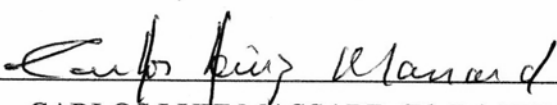
TESE APROVADA EM 16/02/2009



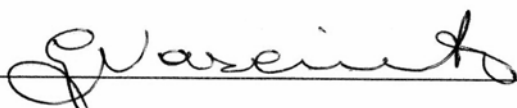
Assinatura
JOÃO LUIZ HORÁCIO FACCINI (Ph.D.) UFRRJ
(Orientador)



ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO (Ph.D) UFF
(Co-orientador)



CARLOS LUIZ MASSARD (Ph.D.) UFRRJ



MARIA DA GRAÇA FICHEL DO NASCIMENTO (Ph.D) AMVERJ



MARIA LÚCIA BARRETO (Dra.) UFF

DEDICATÓRIA

*“Ao meu Deus, soberano sobre
Terra e Céus, fonte de águas vivas e
refúgio em meio a tempestades...”*

*“À toda a minha família pelo
Amor, Respeito, Força, Carinho e
Estímulo...”*

“O Amor é o Dom Supremo”

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine”

“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a Ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei”

“E ainda que eu distribua todos os meus bens entre os pobres e ainda que entregue o meu próprio corpo para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitará”

“O amor é paciente, é benigno; o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se ensoberbece, não se conduz inconvenientemente, não procura os seus interesses, não se exaspera, não se ressentido do mal; não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo crê, tudo espera, tudo suporta...o amor jamais acaba...”

“Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três, porém o maior destes é o amor.”

(1Co 13:1-9,13)

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, pela concessão de saúde, perseverança, renovação das forças todos os dias e pela presença constante em momentos difíceis, minha eterna gratidão.

À minha querida Prof. Dra. Maria Lúcia Barreto, Universidade Federal Fluminense/Núcleo de Animais de Laboratório (UFF/NAL), pela orientação, conselhos, amizade, carinho, respeito, ensinamentos, consideração, apoio na realização desta pesquisa e pela acolhida no NAL, ao longo deste percurso.

Ao Prof. Carlos Augusto Martino Campos (UFF/NAL) pela amizade, estímulo, momentos de alegria, apoio na realização desta pesquisa e ensinamentos.

Aos Funcionários do NAL, Fernando, Bernardino, Gilson e Ana Lúcia, pelo apoio laboratorial no preparo de vidraria, esterilização de materiais e nas atividades diárias e acima de tudo pela amizade.

À todos os funcionários e amigos do NAL, minha eterna gratidão e respeito.

Ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pela orientação na execução desta tese, pelo apoio, paciência, amizade, disponibilidade, ensinamentos, compartilhamento do conhecimento, pela acolhida na sua “Grande Família” do Laboratório de Epidemiologia Molecular (UFF/Dept. Saúde Coletiva e Medicina Veterinária) minha eterna gratidão e admiração.

À querida amiga Juliana Ferreira de Almeida pelo estágio e treinamento em biologia molecular, e acima de tudo pela sua amizade sincera nos momentos de alegria e dificuldades que compartilhamos.

À Prof. Dra. Virgínia Leo pela amizade, ensinamentos, dicas, pela paciência e acima de tudo pela sua amizade sincera e respeito.

A todos os amigos do Laboratório de Epidemiologia molecular (Fernanda Martinez, Leandro, Raquel, Ariane, Môsar Lemos, Felipe Faccini, Liana, Vinicius, David, Daise, Rita, Ana Cláudia, Samira...).

Ao Prof. Dr. João Luiz Horácio Faccini, Departamento de Parasitologia Animal (DPA/IV/UFRRJ), pela orientação, elaboração de projeto de doutorado, pelas portas abertas e contatos, pelos ensinamentos, dicas, apoio durante realização das coletas do material no abatedouro, pela paciência, tolerância, pela amizade, respeito e pelas oportunidades oferecidas, minha eterna gratidão.

Aos alunos, Cátia Costa e Charles, do Laboratório do Prof. Dr. Aivaldo da Fonseca (DPA/IV/UFRRJ), pela ajuda no preparo de tampões para realização das coletas das amostras no abatedouro, agradeço pela presteza com que me atenderam, e acima de tudo pela amizade.

Aos funcionários do DPA/IV/UFRRJ, Ivan e Maurício pela ajuda durante as coletas no abatedouro, e acima de tudo pela amizade e dedicação.

A todos os funcionários e donos do Frigorífico Uirapuã em Barra Mansa, pela permissão para coleta de material e pela amizade.

A Igreja Presbiteriana da Universidade Rural (IPURural), pelo apoio espiritual e amizade nos momentos difíceis, minha segunda família, eterna gratidão.

A todos os amigos e amigas do alojamento da Pós Graduação da UFRRJ, pela amizade, momentos de alegria partilhados, companheirismo, apoio e pela acolhida durante todo período do doutorado.

As amigas Renata Scarlato e Fabiana Dias, pela amizade verdadeira, companheirismo, respeito, pelo apoio, e solicitude nos momentos difíceis, minha eterna gratidão.

A todos os Professores e funcionários do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias/DPA/IV/UFRRJ pelo exemplo de trabalho, dedicação e amor à pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq pelo apoio financeiro para execução desta tese e minha manutenção durante os quatro anos deste projeto.

BIOGRAFIA

SANDRA BATISTA DOS SANTOS, filha de Antonio Bento dos Santos e Marlene Batista dos Santos, nascida a 05 de junho de 1978 na cidade de Paulista, Estado da Paraíba. Concluiu o primeiro grau na Escola Estadual Auzenir Lacerda, tendo finalizado o segundo grau no Colégio Central Aulas na cidade Patos-PB. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Paraíba no ano de 1997, foi monitora das disciplinas de Parasitologia Veterinária I e II do Curso de Medicina Veterinária. Atuou como estagiária nas áreas de clínica e cirurgia de ruminantes e eqüinos (Casa do Criador Ltda), além de clínica de pequenos animais (Pet Shop 4 Patas). Participou de Projetos de Extensão Rural (UFCG) para implantação de programa hortas com economia de água em escolas carentes da cidade de Patos-PB. Graduou-se em Medicina Veterinária em setembro de 2003 pela Universidade Federal de Campina Grande. Em março de 2003, ingressou no Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a nível de mestrado, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em março de 2005 ingressou no Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a nível de doutorado, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A partir de 2006 vem atuando na área de Micoplasmologia e Diagnostico Imunológico e Molecular no NUDMIC/UFF, como parte de desenvolvimento de Tese de doutorado e assistência laboratorial. Participou de vários congressos na área de Parasitologia Veterinária e Microbiologia, tendo divulgado pesquisas desenvolvidas através de resumos científicos e artigos.

RESUMO

SANTOS, Sandra Batista. **Imunoperoxidase e métodos moleculares na detecção de *Mycoplasma* spp. (Mollicutes: Mycoplasmataceae) em conduto auditivo de bovinos e em *Railletia* spp. (Gamasida:Railletidae).** 2009. 76p. Tese (Doutorado em Ciências, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Mycoplasmas são os menores e mais fastidiosos procariotos conhecidos, sendo responsáveis por altas perdas econômicas relacionadas a produtividade em ruminantes. Micoplasmas tem sido encontrados com frequência em conduto auditivo de caprinos. Nestes casos, estão estreitamente relacionados com ácaros Psoroptidae e Railletidae, que carregam e disseminam micoplasmas entre os rebanhos. No Brasil, estudos sobre *Mycoplasma* em conduto auditivo de bovinos inexistem. Assim, no **Capítulo I**, foram levantados dados sobre prevalência de micoplasmas presentes no conduto auditivo de bovinos e sua associação com ácaros *Railletia* spp., além da identificação das duas espécies de *Railletia* spp. parasitas de conduto auditivo de bovinos da região sudeste do Estado do Rio de Janeiro. A prevalência de *Mycoplasma* spp. no conduto auditivo de bovinos foi considerada alta, 80% (48/60). A prevalência de *Railletia* spp. foi de 76,7% (46/60). Em 40 (74,1%) animais verificou-se parasitismo por *Railletia* spp. e *Mycoplasma* spp., esta associação foi altamente significativa ($p < 0,001$). Das fêmeas de *Railletia* identificadas 52,3% (101/193) foram *R. auris* e 47,7% (92/193) foram *R. flechtmani*. comprovou-se que micoplasmas e ácaros do conduto auditivo de bovinos estão estreitamente relacionados e que neste sítio de localização estão presentes *Mycoplasmas* com alto potencial patogênico para bovinos. No **Capítulo II**, foi realizada tipificação molecular dos isolados de *Mycoplasma* pertencentes ao Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) através da técnica de PCR-REA, sendo estes resultados comparados com os obtidos na técnica de imunoperoxidase indireta (IPI). A prevalência obtida para o GMM na IPI foi de 20,0% (12/60) enquanto na PCR-REA foi de 41,7% (25/60). Das espécies de *Mycoplasma* tipificadas pela IPI 58,3% (7/12) foram *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e 41,7% (5/12) foram *M. capricolum*. Na PCR-REA, GMM, foi confirmado pela visualização de um amplicon de 785bp, compatível com este grupo. Na clivagem do produto da PCR com a enzima de restrição *AluI*, os fragmentos obtidos foram compatíveis com cepas padrão do GMM, e dos isolados de conduto auditivo de bovinos estudados, nenhum fragmento de 370pb compatível com *MmmSC*, biotipo bovino foi encontrado.

Palavras chave: *Mycoplasma* spp., ouvido de bovino, *Railletia* spp.

ABSTRACT

SANTOS, Sandra Batista. **Immunoperoxidase and molecular methods in the detection of *Mycoplasma* spp. (Mollicutes: Mycoplasmataceae) in the ear canal of bovine and in *Raillietia* spp (Gamasida:Raillietidae).** 2009. 76p. Thesis (Doctoral in Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Mycoplasma are the smallest and more fastidious prokaryotes known, being responsible by high economical losses in livestock production. Mycoplasmas has been found frequently in the ear canal of goats. In these cases, are very closely related with mites, Psoroptidae and Raillietidae, that carried and disseminate mycoplasmas among the flocks. In Brazil, studies related mycoplasmas in the ear canal of bovine inexistent. Like this, in the **Chapter I**, were surveyed up data on prevalence of mycoplasmas in the ear canal of bovine and your association with mites *Raillietia* spp., and identification of the two *Raillietia* species that occur in bovine of southeast, State Rio de Janeiro. The prevalence of *Mycoplasma* spp. in the ear canal of bovine was considered high, 80% (48/60). In these animals high prevalence was verified *Raillietia* spp. 76.7% (46/60). The parasitism by mycoplasmas and mites was verified in 40 animals (74.1%), this association was highly significant ($p < 0.001$). Of the females of identified *Raillietia* 52.3% (101/193) were *R. auris* and 47.7% (92/193) were *R. flechtmanni*. In this study, was proven that mycoplasmas and mites in the ear canal of the bovine are closely related and these habitat occur potentially pathogenic mycoplasmas for cattle herds. In the **Chapter 2**, *Mycoplasma mycoides* Cluster (GMM) was diagnosed by PCR-REA and indirect immunoperoxidase (IPI), both, carried out in mycoplasmas isolates of the ear canal. In this study, 35 strains selected in agreement with their biochemistry and physiologic properties, were used. Under IPI the prevalence obtained for GMM was 20.0% (12/60) while by PCR-REA it was 41.7% (25/60). The IPI typing of these isolates resulted in 58.3% (7/12) for *M. mycoides mycoides* LC and 41.7% (5/12) for *M. capricolum*. PCR-REA for *M. mycoides* Cluster was confirmed by the amplicon size of 785bp, compatible with this group. After restriction analysis with *AluI* in all *M. mycoides* cluster strains and ear canal samples the fragments size obtained were compatible with this group, and neither fragment of 370bp that is compatible with *MmmSC* of bovine origin it was visualized.

Key words: *Mycoplasma* spp., ear canal bovine, *Raillietia* spp.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

- Tabela 1.** Frequência das espécies de *Mycoplasma* sp. isoladas em conduto auditivo de bovinos de abate, do sudeste do Estado do Rio de Janeiro, tipificados pela técnica de imunoperoxidase indireta.....24
- Tabela 2.** Frequência de co-infecção das espécies de *Mycoplasma* spp. encontradas no conduto auditivo de bovinos de abate, do Estado do Rio de Janeiro.....24
- Tabela 3.** Relação entre a ocorrência de ácaros *Raillietia* spp. e *Mycoplasma* spp. no conduto auditivo de bovinos de abate.26
- Tabela 4.** Frequência da associação de *Mycoplasma* no interior de ácaros *Raillietia* spp. em isolados de bovinos de abate.26
- Tabela 5.** Frequência de *Mycoplasma* spp. em fêmeas de *R. auris* e *R. flechtmanni* parasitas de conduto auditivo de bovinos de abate, do sudeste do Estado do Rio de Janeiro.27
- Tabela 6.** Frequência de *Mycoplasma* spp. em machos de *R. auris* e *R. flechtmanni* parasitas de conduto auditivo de bovinos de abate, do sudeste do Estado do Rio de Janeiro.27
- Tabela 7.** Espécies de *Mycoplasma* isoladas de ácaros *R. auris* e *R. flechtmanni*, coletados de conduto auditivo de bovinos de abate.....28
- Tabela 8.** Frequência de co-infecção das espécies de *Mycoplasma* spp. encontradas em ácaros *Raillietia* spp.....29
- Tabela 9.** Resultados do crescimento de *Mycoplasma* spp. na 5ª lavagem e após macerado dos ácaros *R. auris* e *R. flechtmanni*, coletados de conduto auditivo de bovinos de abate, do sudeste do Estado do Rio de Janeiro.29

CAPITULO II

- Tabela 1.** Resultados obtidos entre os isolados de *Mycoplasma* spp. do Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) detectados através de IPI e PCR, em de conduto auditivo de bovinos, no sudeste do Estado do Rio de Janeiro.....47

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

- Figura 1A.** Colônias de *Mycoplasma* spp. em forma típica de “ovo frito” observadas em microscópio estereoscópio (40X). 23
- Figura 1B.** Colônias de *M. mycoides mycoides* LC (Y-goat), tipificadas pela reação da imunoperoxidase indireta, isolados de conduto auditivo de bovinos (40X)..... 23
- Figura 2.** Ácaro do gênero *Raillietia* spp. isolado de conduto auditivo de bovinos de abate, Rio de Janeiro, Brasil. 25

CAPITULO II

- Figura 1.** Resultado obtido pela IPI em cultivos de lavados de conduto auditivo de bovinos, colônias de micoplasma reativas para *M. mycoides mycoides* LC (*Mmm*LC). 46
- Figura 2A.** Resultados da PCR-REAP para GMM, em cultivos de lavados de conduto auditivo de bovinos, no sudeste do Estado do Rio de Janeiro. M: marcador de peso molecular (Ladder 100pb), Lane 1-5: micoplasmas isolados de lavados de ouvido tipificados pela IPI (Lanes 1,2,4 e 5: *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC; Lane 3: *M. capricolum* subsp. *Capricolum*). 48
- Figura 2B.** Resultados dos fragmentos obtidos para o GMM, restrição de endonuclease com *AluI*. M: Ladder 100pb, Lane: 1-5 em cultivos de lavados de conduto auditivo de bovinos, tipificados pela IPI. 49
- Figura 3A.** Resultados dos amplicons obtidos na PCR-REAP para *Mycoplasma* spp. membros do GMM em isolados de conduto auditivo de bovinos estudados. 50
- Figura 3B.** Resultados dos fragmentos obtidos na PCR-REA, com restrição de endonuclease *AluI*, em isolados de conduto auditivo de bovinos estudados. 51
- Figura 4.** PCR específico para *Mmm*LC e *Mmc* em cepas de referência do GMM. 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: American type culture collection
CBPP: Contagious bovine pleuropneumonia
CCPP: Contagious caprine pleuropneumonia
DNA: Desoxiribonucleic acid
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
G+C: Guanina-Citosina
GMM: Grupo *Mycoplasma mycoides*
IBK: Infectious bovine Keratoconjunctivitis
IKC: Infectious Keratoconjunctivitis Caprine “pink-eye”
MAKePS: mastite-artrite-keratoconjuntivite e pneumonia-septicemia
Mcc: *Mycoplasma capricolum capricolum*
Mccp: *Mycoplasma capricolum capripneumoniae*
Mmc: *Mycoplasma mycoides capri*
MmmLC: *Mycoplasma mycoides mycoides* Large colony
MmmSC: *Mycoplasma mycoides mycoides* Small colony
OIE: Organização Internacional de Epizootias
PCR: Polimerase chain reaction
PCR-LIF: PCR-Laser Induced fluorescence
Pmol: picomol
µL: microlitro
PPLO: Pleuropneumonia like organisms
PCR-REAP: PCR - Restriction endonuclease
RFLP: Restriction fragment length polymorphism
SDS: sódio duodecil sulfato
SIC: Serviço de Informação da Carne
TE: Tris-EDTA
UFC: unidades formadoras de colônias
VVG: Vulvo vaginite granular

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| CAPITULO I | 3 |
| RESUMO | 4 |
| ABSTRACT | 5 |
| 1. REVISÃO DE LITERATURA | 6 |
| 1.1 Micoplasmoses dos Ruminantes | 6 |
| 1.2 Micoplasmas e Ácaros de Conduto Auditivo de Ruminantes | 12 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 2.1 Coleta das amostras e procedimentos para isolamento de <i>Mycoplasma</i> spp. de lavados de conduto auditivo de bovinos | 18 |
| 2.2 Processamento de ácaros do gênero <i>Raillietia</i> spp. para isolamento de <i>Mycoplasma</i> spp. | 19 |
| 2.3 Tipificação das espécies de <i>Mycoplasma</i> spp. isoladas de conduto auditivo de bovinos e de ácaros do gênero <i>Raillietia</i> spp. | 19 |
| 2.3.1 Imunoperoxidase indireta | 19 |
| 2.4 Análise estatística | 20 |
| 3. RESULTADOS | 22 |
| 3.1 Animais e fatores epidemiológicos | 22 |
| 3.2 Isolamento de micoplasmas em conduto auditivo de bovinos | 22 |
| 3.3 Presença de <i>Mycoplasma</i> sp. e ácaros <i>R. auris</i> e <i>R. flechtmanni</i> no conduto auditivo de bovinos | 26 |
| 4. DISCUSSÃO | 30 |
| 5. CONCLUSÕES | 34 |
| CAPITULO II | 35 |
| RESUMO | 36 |
| ABSTRACT | 36 |
| 6. REVISÃO DE LITERATURA | 38 |

| | |
|---|----|
| 7. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 7.1 Cultivos de <i>Mycoplasma</i> spp. | 43 |
| 7.2 Processamento de Micoplasmas para PCR-REAP e PCR-REA | 44 |
| 7.3 PCR para MMMLC | 44 |
| 7.4 PCR para MMMSC | 45 |
| 8. RESULTADOS | 46 |
| 8.1 Micoplasmas do GMM tipificados por IPI e PCR-REAP | 46 |
| 8.2 Resultados da PCR para MMMLC e MMMSC | 52 |
| 9. DISCUSSÃO | 53 |
| 10. CONCLUSÕES | 55 |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 56 |
| ANEXOS | 72 |
| A – Coloração de Dienes (Dienes 1945) | 72 |
| B - Sensibilidade a digitonina | 72 |
| C - Prova de urease | 72 |
| D - Fermentação de glicose | 72 |
| E – Hidrolise arginina | 73 |
| F - Meio Hayflick´s modificado | 73 |
| G – Reagentes utilizados no teste de Imunoperoxidase indireta (IMADA et al., 1987) | 73 |
| H – Árvore filogenética de micoplasmas demonstrando os principais grupos com base no gene 16SrRNA | 75 |
| I – Quadro com características e classificação taxonômicas de Mollicutes. | 76 |

INTRODUÇÃO

A produção pecuária no Brasil teve início durante a época da colonização no Século XVI, onde inicialmente os animais foram introduzidos para tração mecânica e como fonte de alimento. A partir dos Séculos XIX os rebanhos foram melhorados com a introdução de raças européias e zebuínas. As amplas extensões territoriais do país, diversidade climática e de pastagens foram fatores que contribuíram para adaptação dos rebanhos e desenvolvimento do setor (SERVIÇO DE INFORMAÇÃO DA CARNE-SIC, 2009). De acordo com levantamentos feitos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007), o Brasil detém o maior rebanho bovino do mundo com 205,9 milhões de cabeças, com os maiores rebanhos concentrados na região centro oeste (34%). Também é reconhecido como um dos maiores exportadores de carne para Comunidade Européia, destacando-se como produtor de “boi de pasto” e pela qualidade sanitária dos rebanhos (SIC, 2009). No entanto, no País ainda persistem condições que dificultam a manutenção deste padrão sanitário como a presença constante de doenças infecciosas e parasitárias, causando sérios prejuízos econômicos devido a custos com medicamentos, assistência veterinária, redução da cadeia produtiva e alta morbidade e mortalidade de animais.

Dentre as doenças infecciosas destacam-se as micoplasmoses, que são um complexo de doenças infecciosas causadas por várias espécies de bactérias do gênero *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. as quais acometem animais de produção, de companhia e selvagens. Micoplasmoses são responsáveis por enormes perdas econômicas a bovinocultura nacional, e em alguns casos restrições internacionais as exportações de carne. Os prejuízos no setor estão relacionados aos custos com tratamento e implementação de programas de controle e erradicação, além das altas taxas de mortalidade. Na Europa as perdas anuais causadas por doenças respiratórias em bovinos somam 576 milhões de euros, e micoplasmas ocupam a terceira posição. Enquanto na América do Norte, Estados Unidos, somente *M. bovis* é responsável por prejuízos equivalentes a 32 milhões de dólares por ano, este valor chega a 108 milhões de dólares quando se trata de mastite (NICHOLAS; AYLING, 2003; ROSENGARTEN; CITTI, 1999). No Brasil, do mesmo modo, as infecções micoplásmicas em bovinos ocasionam prejuízos econômicos a bovinocultura, onde se destacam problemas como mastite, pneumonias, otites, poliartrite e distúrbios reprodutivos (METTIFOGO et al., 1996; NASCIMENTO et al., 1986; NASCIMENTO et al., 1998). Uma vez infectado, os rebanhos permanecem como portadores assintomáticos ou subclínicos, representando risco para rebanhos livres.

Micoplasmas estão amplamente distribuídos em diferentes sítios de localização nos hospedeiros e podem ser encontrados colonizando a orofaringe, cavidade nasal, pulmões, mucosa ocular, conduto auditivo, sistema reprodutor e urinário e outros (WHITFORD et al., 1994). Embora estes agentes sejam conhecidos por causarem doenças nos seus hospedeiros, muitos são considerados como saprófitas e endosimbiontes de animais, plantas e insetos. Também estão estreitamente relacionados com ácaros gamasídeos e psoroptídeos, parasitas de conduto auditivo de bovinos, búfalos, caprinos e ovinos (COTTEW; YEATS, 1981, 1982; DaMASSA, 1991). Estes ácaros têm sido incriminados como disseminadores destes microorganismos entre rebanhos livres e infectados. Ácaros *Raillietia* spp. são encontrados em altas prevalências em várias regiões do País, e micoplasmas são frequentemente encontrados em associação com *R. caprae* no conduto auditivo de caprinos (COTTEW;

YEATS, 1981, 1982). No entanto, pouco se conhece sobre a possível relação entre as espécies de *Raillietia* que parasitam o conduto auditivo de bovinos e micoplasmas. Diante destas considerações objetivou-se pesquisar micoplasmas no conduto auditivo de bovinos de abate no Estado do Rio de Janeiro, Brasil e estabelecer uma possível associação entre a presença destes mollicutes com os ácaros do gênero *Raillietia* spp. comum neste habitat.

No Capítulo 1 são abordados dados sobre a prevalência das espécies de *Raillietia* spp. presentes no conduto auditivo de bovinos no Brasil e sua associação com micoplasmas deste sítio, além da tipificação imunoenzimática das cepas que ocorrem tanto nos ácaros quanto nos condutos auditivos destes animais. No Capítulo 2 foi realizada uma abordagem a partir de diagnóstico molecular dos isolados do Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) que foram identificados nos ouvidos de bovinos. Foram estabelecidas relações com cepas padrões de caprinos e de bovinos. Tendo em vista que as cepas do GMM são reconhecidas mundialmente devido às altas perdas econômicas que causam aos produtores em todo o mundo (Organização Internacional de Epizootias-OIE, 2008ab). Destacando-se principalmente por conter neste grupo as espécies que causam a CBPP e CCPP, doenças de notificação obrigatória a OIE, bem como pelas semelhanças bioquímicas, fisiológicas e moleculares entre os membros do grupo, onde somente técnicas moleculares são capazes de distingui-las.

CAPITULO I

PRESENÇA DE *Mycoplasma* SPP. (MOLLICUTES: MYCOPLASMATACEAE) E ÁCAROS *Railletia auris* E *R. flechtmanni* (GAMASIDA:RAILLIETIDAE) EM CONDUTO AUDITIVO EXTERNO DE BOVINOS ASSINTOMÁTICOS PARA MICOPLASMOSES, NO SUDESTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

Presença de *Mycoplasma* spp. (Mollicutes: Mycoplasmataceae) e ácaros *Raillietia auris* e *R. flechtmanni* (Gamasida:Raillietidae) em conduto auditivo externo de bovinos assintomáticos para micoplasmoses, no sudeste do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

No período de março a abril de 2006 foram realizadas lavagens no conduto auditivo de 60 bovinos abatidos para consumo humano em abatedouro comercial. Os animais foram escolhidos de forma aleatória e eram de ambos os sexos, adultos e mestiços de raças zebuínas e taurinas, procedentes de municípios do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. A região é caracterizada por clima tropical úmido com precipitação anual de 1200mm³, umidades de 70-90%, temperaturas de 24-30 °C e com altitudes de 26 a 407m, área agrosilvopastoril com destaque na pecuária de corte. As lavagens foram feitas com uso de seringas estéreis com sonda plástica acoplada contendo um volume de 60 mL de solução salina tamponada (PBS pH 7,2). As amostras obtidas foram armazenadas em glicerol (1:2) e estocadas a -20°C até o uso. Estas amostras foram diluídas até 10⁻⁵ e repicadas em meio Hayflick modificado, sólido e líquido, sendo incubados a 37°C por 48-72 horas. As placas foram mantidas sob condições de microaerofilia e observadas diariamente em estereoscópio (40X) para visualização das colônias típicas em “ovo-frito”. A confirmação do isolamento do gênero *Mycoplasma* spp. baseou-se nas provas de Dienes e digitonina, e a tipificação das cepas isoladas foi realizada pelo teste de imunoperoxidase indireta. Os ácaros coletados nos lavados de conduto auditivo foram separados, contados e sexados, sendo lavados sucessivamente em 1mL de meio Hayflick modificado. Em seguida com estilete entomológico estéril foram seccionados através de uma linha imaginária entre a parte posterior do podossoma e a parte anterior do opistossoma. A parte posterior do opistossoma foi macerada e processada para isolamento de *Mycoplasma* spp. enquanto a porção podossomal foi armazenada em álcool etílico a 70% e montada em Hoyer's, visando com isso separar as fêmeas das espécies *R. auris* e *R. flechtmanni*. A prevalência de *Mycoplasma* spp. no conduto auditivo de bovinos foi de 80% (48/60). As espécies isoladas no conduto auditivo de bovinos foram: *M. alkalescens* 12,5% (6/48), *M. arginini* 2,1% (1/48), *M. bovirhinis* 8,3% (4/48), *M. bovis* 2,1 (1/48), *M. conjunctivae* 25% (12/48), *M. mycoides mycoides* LC 14,6% (7/48) e *M. capricolum* 10,4% (5/48). A prevalência de *Raillietia* spp. foi de 76,7% (46/60). Em 74,1% (40/54) dos animais, ácaros e micoplasmas foram encontrados simultaneamente, esta associação foi altamente significativa (p<0,001). A relação macho:fêmea foi de 1:8. Dentre os ácaros processados para isolamento de *Mycoplasma* spp. 193 eram fêmeas e 25 machos. A prevalência de micoplasmas em *Raillietia* spp. foi de 81,2% (177/218), esta frequência foi altamente significativa (p<0,001). Das fêmeas identificadas 52,3% (101/193) eram *R. auris* e 47,7% (92/193) eram *R. flechtmanni*. A prevalência de micoplasmas nas fêmeas de *R. auris* foi de 75,2% (76/101) e em *R. flechtmanni* de 88% (81/92) (P<0,05). Dos ácaros machos processados 56% (14/25) eram da espécie *R. auris* e 44% (11/25) eram *R. flechtmanni*. Nos machos de *R. auris* a prevalência de *Mycoplasma* spp. foi de 78,6% (11/14) e para *R. flechtmanni* foi de 81,8% (9/11). As cepas de micoplasmas isoladas nos ácaros foram às mesmas presentes ouvido dos bovinos. No conduto auditivo dos bovinos estudados foram encontradas várias cepas micoplasmas potencialmente patogênicas para bovinos e caprinos, e estes mollicutes estão estreitamente associados com ácaros do gênero *Raillietia* spp. que albergam estas cepas no seu organismo.

Palavras chave: Micoplasma, Acari, conduto auditivo de bovinos

ABSTRACT

Presence of *Mycoplasma* spp. (Mollicutes: Mycoplasmataceae) and mites *Raillietia auris* and *R. flechtmanni* (Gamasida:Raillietidae) in the external ear canal of bovine assintomatic for mycoplasmosis, southeast of the Rio de Janeiro State, Brazil.

In the month of march at april of 2006 aleatory flushing were carried out in the external ear canal of 60 bovine at slaughter time in an abattoir of Rio de Janeiro State, Southeastern, Brazil. The animals were of both sexes, varied ages and different breeds and coming from located districts. This area is characterized by humid tropical climate with annual precipitation of 1200mm³, humidities between 70 at 90%, temperatures of 24 at 30 °C and altitudes of 26 at 407m, region with predominance of the agriculture and livestock production. Steril syringes (60ml) loaded with buffer solution (PBS, pH 7.2) were used for the ear canal flushing. The obtained samples were stored in the glycerol (1:2) at -20 °C until use. These strains were diluted up to 10⁻⁵, inoculated in liquid and solid modified Hayflick's medium and incubated at 37°C for 2-3 days, being the plates put into jar for the obtention of microaerophilia condition. The agar plates were observed every two days under stereomicroscope (40X) for the presence of typical colonies "fried-egg". Mycoplasmas isolates were confirmed for Dienes and digitonin probes and typical colonies were used for typification by the indirect imunoperoxidase test with paper discs saturated with hyperimmune rabbit sera. The mites colleted were separate and counted. A pool of mites from each sampled bovine was washed five times sucessively in 1mL of liquid modified Hayflick's medium as to eliminate mycoplasmas in the external mite bodies. The two parts from the body of the mites podosoma and opisthosoma, were cut and separated out. The opisthosoma was processed for mycoplasmas isolation, while the podosoma was stored in ethyl 70% alcohol and mounted in Hoyer's solution for identification females of the species *Raillietia* spp. The prevalence of *Mycoplasma* spp. in the studied bovine was 80% (48/60). The percentages of typified species in the flushing ear canals of bovine were 12.5%, for *M. alkalenses*; 2.1%, *M. arginini*; 8.35%, *M. bovirhinis*; 2.1%, *M. bovis*; 25.0%, *M. conjunctivae*; 14.6%, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC and 10.4% *M. capricolum*. In these animals high prevalence was verified *Raillietia* spp. 76.7% (46/60). The parasitism by mycoplasmas and mites was verified in 40 animals (74.1%), this association was significant (p<0.001). Among the mites processed for isolation mycoplasmas 193 were female and 25 males. The ratio female:male were 7.7 (193:25). The frequency of mycoplasmas in *Raillietia* spp. was of 81.2% (177/218) (p<0.001). For identified females 52.3% (101/193) were *R. auris* and 47.7% (92/193) were *R. flechtmanni*. The frequency of mycoplasmas in the females of *R. auris* was of 75.2% (76/101) and 88% (81/92) in *R. flechtmanni* (P<0.05). Of the processed male mites 56% (14/25) were *R. auris* and 44% (11/25) were *R. flechtmanni*. In the males *R. auris* the frequency of mycoplasmas was of 78.6% (11/14) and *R. flechtmanni* was of 81.8% (9/11). The species of identified mycoplasmas in the external ear canal bovine and mites was exactly the same. The results confirm that the external ear canal cattle's ear canal is also a mycoplasmas source, including potentially pathogenic species for cattle and goats herds, and these mollicutes are closely related with mites *Raillietia* spp. that is carrier and this agent in your organism.

Key words: Mycoplasmas, Acari, ear canal of bovine

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Micoplasmoses dos Ruminantes

A classe Mollicutes é composta por quatro ordens e cinco famílias, onde são encontrados diversos microorganismos que são parasitas, endosimbiontes, comensais e saprófitas de humanos, animais, insetos e plantas. Filogeneticamente os Mollicutes estão estreitamente relacionados com bactérias Gram positivas e possuem baixo conteúdo de G+C no genoma (RAZIN et al., 1998; BLANCHARD; BROWNING, 2005). Nesta classe, além das famílias conhecidas, também são encontrados *Phytoplasmas* com posições taxonômicas indefinidas (RAZIN et al., 1998). Os principais gêneros associados a insetos e plantas são *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma* e *Phytoplasma*. Estes microorganismos foram designados de “mycoplasmas like organisms-MLOs”, devido a sua semelhança morfológica e ultra-estrutural com *Mycoplasma* (NOCARD; ROUX, 1898). Em plantas estes microorganismos são responsáveis por diferentes patologias e são uma constante preocupação aos pesquisadores da área, uma vez que podem causar sérios prejuízos econômicos a produção agrícola. Nesta área, ao contrário da Medicina Veterinária, a presença de insetos como vetores biológicos tem maior importância, pois estes são responsáveis pela transmissão (biológica e mecânica) e disseminação de micoplasmas entre plantas (NIENHAUS; SIKORA, 1979; DAVIS; WHITCOMB, 1971; WHITCOMB; DAVIS, 1970; WHITCOMB; BOVÉ, 1983; GARNIER et al., 2001; GRAY; BANERGEE, 1999). Em animais e artrópodes ectoparasitos, os mollicutes podem ser encontrados como constituintes da flora microbiana ou como patogênicos. Assim *Asteroplasma* e *Anaeroplasma* podem ser encontrados como endosimbiontes e comensais no rúmen de bovinos e ovinos, enquanto *Mycoplasma*, *Acholeplasma* e *Ureaplasma* estão geralmente relacionados com acarinos e dípteros (WHITCOMB; BOVÉ, 1983; RAZIN et al., 1998; WHITFORD et al., 1994; PHILIP; BURGDORFER, 1961) e frequentemente são responsáveis por ocasionar doenças em humanos, animais domésticos e de produção.

Mycoplasmas são considerados os menores procariotos conhecidos, com capacidade de auto-replicação e polimorfismo. Foram descritos há mais de 100 anos atrás, e hoje, são conhecidas aproximadamente 190 espécies, encontradas em humanos, animais, plantas e insetos. Estão mundialmente distribuídos e foram reconhecidos como agentes infecciosos desde o século XVIII. Inicialmente foram cultivados por Nocard e Roux (1898) e Dienes (1945), e receberam a denominação de “Pleuropneumonia like organisms-PPLO”. Estes microorganismos possuem um genoma extremamente pequeno (0,58-2,2 Mb), o que resulta em restritas opções metabólicas para replicação e sobrevivência (RAZIN et al., 1998; ROTTEM, 2003). Devido a sua limitada capacidade de biosíntese muitos micoplasmas são parasitas e exibem estreita especificidade pelos tecidos dos hospedeiros. E, ao longo do processo evolutivo, micoplasmas e hospedeiros co-evoluíram, resultando em interações metabólicas entre ambos. Ao entrar em contato com hospedeiros adequados, estes mollicutes têm mecanismos evoluídos para interagir com o sistema imune, permitindo replicação, transferência e colonização de novos hospedeiros (RAZIN et al., 1998; ROTTEM 2003; BLANCHARD; BROWNING, 2005). Nos hospedeiros vertebrados são encontrados em diferentes sítios de localização colonizando o trato respiratório, urogenital, conduto auditivo, mucosa ocular, glândula mamária, articulações e placenta, além de diferentes linhagens celulares, tais como: células epiteliais, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, células epiteliais

dos ductos biliares e células tubulares renais (THOMAS et al., 1987; ADEGBOYE et al., 1995; RODRÍGUEZ et al., 1996; RAZIN et al., 1998).

Em animais de produção *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são os mais importantes, devido as perdas econômicas que causam aos produtores de bovinos, ovinos e caprinos em todo mundo. Em bovinos são várias as espécies de *Mycoplasma* encontradas, tendo sido descritas aproximadamente 20 espécies diferentes e uma de *Ureaplasma* (WHITFORD et al., 1994). As principais espécies que ocorrem em bovinos são: *Mycoplasma mycoides mycoides* SC (*MmmSC*), *M. bovis*, *M. capricolum*, *M. californicum*, *M. canadense*, *M. alkalescens*, *M. bovigenitalium*, *M. bovirhinis*, *M. conjunctivae*, *M. verecundum*, *M. bovoculi*, *M. arginini*, *M. alvi*, *M. dispar* e *U. diversum*. Algumas delas são constituintes da flora normal em diferentes sítios e outras são patogênicas (ALBERTI et al., 2006). Além das espécies citadas acima, eventualmente, algumas das de caprinos podem ser encontradas em bovinos, como *M. mycoides mycoides* LC (*MmmLC*, cepa Y-goat) e *M. mycoides capri* (SANTOS et al., Prelo 2008; Organização Internacional de Epizootias-OIE, 2008b).

M. mycoides mycoides SC (*MmmSC*) é uma das mais importantes espécies pertencente ao Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM), é mundialmente conhecida por ser o agente etiológico da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (CBPP). Esta doença foi descrita na Europa somente no Século XVI e se difundiu em vários países do mundo no Século XIX, com o aumento do trânsito de animais vivos entre países. No Século XX foi erradicada, embora ainda persista no continente africano. Na Ásia a situação epidemiológica da CBPP é incerta, e na Europa desde 1999, não tem sido notificados surtos (OIE, 2008a). Em condições naturais *MmmSC* acomete somente ruminantes do gênero *Bos*, principalmente bovinos zebus. No entanto o biotipo bovino (*MmmSC*) tem sido isolado de búfalos (*Bubalus bubalus*) na Itália (SANTINI et al., 1992), e em caprinos e ovinos na África, Nova Guiné, Sudão, Nigéria, Portugal, Índia e Brasil (DaMASSA et al., 1992; SRIVASTAVA et al., 2000; NASCIMENTO et al., 1986; PEREIRA et al., 2003). Cepas de *MmmSC* também já foram reportadas em búfalo americano (*Bison bison*), embora não tenha sido isolada em búfalos africanos (*Syncerus caffer*) e outros ruminantes selvagens. A CBPP se manifesta com sintomas de anorexia, febre e sinais respiratórios (dispnéia, polipnéia), além de tosse e descarga nasal (OIE, 2008a). Em surtos agudos produzidos experimentalmente as taxas de mortalidades estão acima de 50%. De acordo com a OIE (2008a) podem ocorrer formas subagudas ou assintomáticas, e animais infectados permanecem como carreadores tendo uma função epidemiológica importante na persistência da doença em alguns rebanhos. As principais estratégias de controle são a detecção precoce de surtos, controle de movimento de animais e políticas de vigilância sanitárias rigorosas. Na África o controle da CBPP, inclui campanhas de vacinação a campo.

As espécies *M. bovis*, *M. capricolum*, *M. californicum*, *M. canadense* e *M. dispar* são responsáveis por diferentes síndromes, envolvendo surtos de mastite, agalaxia, pneumonias, otites, poliartrite, abortos e outras patologias inespecíficas (GONZALEZ et al., 1993). Em casos de mastite, segundo Gonzalez e Wilson (2003), existem cerca de 11 espécies de micoplasmas associadas à doença, mas as que merecem maior destaque são: *M. alkalescens*, *M. bovis*, *M. bovigenitalium*, *M. californicum*, *M. bovirhinis* e *M. canadense*. Outras espécies como *M. bovoculi*, *M. gallinaarum* e *M. canis* eventualmente podem ser encontradas em amostras de leite, o que pode ser devido a contaminações externas (AYLING et al., 2004).

Na síndrome de mastite-agalaxia dos rebanhos bovinos leiteiros, *Mycoplasma bovis*, é a principal espécie de *Mycoplasma* envolvida. Esta tem sido descrita em todo o mundo, causando perdas econômicas (FOX et al., 2005). Hale et al. (1962) relataram o primeiro caso de mastite bovina por *M. agalactiae* subespécie *bovis*. Stalheim e Stone (1975) registraram

surtos de artrite em rebanhos bovinos em Iowa e Nebraska, causada por *M. agalactiae* subespécie *bovis* Donetta e posteriormente esta espécie foi denominada de *M. bovis* por Aska e Erno (1976). Mastites em bovinos foram relatadas em vários países como: Estados Unidos (Califórnia) por Jasper (1967), Grã-Bretanha (BOUGHTON, 1979), Alemanha (PFUTZNER; SACHSE, 1996), Brasil (METTIFOGO et al., 1996; PRETTO et al., 2001). Jackson e Boughton (1991) relataram surtos de mastite por *M. bovigentialium* em vacas secas e em parturientes, onde a provável fonte de infecção foi o trato urogenital, em alguns destes animais ocorreram infecções mistas com *M. californicum* e *M. canadense*. Espécies do Sorogrupo bovino 7, *M. bovirhinis* e *M. dispar*, foram descritas em surtos recentes de mastite, com evidências de prevalência de 1-8% em tanques receptores de leite nos Estados Unidos (HUM et al., 2000; AYLING et al., 2004).

De acordo com Fox et al. (2005) os dois principais fatores de risco associados à mastite bovina são a introdução de animais assintomáticos nos rebanhos e falhas no manejo sanitário durante os procedimentos de ordenha. Segundo estes autores durante muitos anos acreditava-se que mastites por micoplasmas poderiam ser controladas com medidas de higiene durante a ordenha, eliminação de animais doentes e controle na introdução de animais novos. No entanto, de acordo com estudos na epidemiologia das micoplasmoses em rebanhos leiteiros, sabe-se que tais estratégias não são suficientes para prevenir a ocorrência de mastite e possíveis surtos da doença (PFUTZNER; SACHSE, 1996; AYLING et al., 2004; FOX et al., 2005), uma vez que há evidências de transmissão horizontal e vertical de *M. bovis* como consequência de mastite. Nestes casos também ocorre difusão hematogena do agente para todos os órgãos do corpo (PFUTZNER; SACHSE, 1996). Segundo Birne et al. (2001) na República da Irlanda, *M. bovis* está associado principalmente a doenças respiratórias em bezerros e a surtos esporádicos de mastite em rebanhos. Estes autores registraram a ocorrência de casos de artrite provocada por *M. bovis*. Assim, vacas com mastites predisõem a infecções respiratórias e artrite em bezerros, tendo como provável rota de infecção o trato respiratório. Na Austrália, estima-se que no mínimo 50% dos rebanhos de leite sofram de mastite subclínica, gerando perdas econômicas em torno de 60 milhões de dólares ao ano para indústria láctea (GHADERSOHI et al., 1999). Segundo Ghadersohi et al. (1999) em casos de mastites causadas por *M. bovis* associadas com *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, estes atuam sinergicamente, determinando uma doença clínica mais severa. Além disso, é provável que *M. bovis*, exerça uma ação imunossupressora nos animais e favoreça outras infecções bacterianas. De acordo com Adegboye et al. (1995) *M. bovis* nos Estados Unidos causa pneumonias crônicas com formação de abscessos em bezerros, as prevalências nestes casos estão acima de 50%. Rodríguez et al. (1996), em análise imunohistoquímica de animais com pneumonias por *M. bovis*, detectaram este agente em bronquíolos e em vias aéreas terminais, bem como na superfície de células epiteliais dos ductos biliares e no epitélio tubular renal, em estreita associação com infiltrados de neutrófilos e macrófagos. Nos Estados Unidos e Canadá, pneumonias em bezerros causadas por *M. bovis* são resistentes a antibioticoterapia convencional (RODRÍGUEZ et al., 1996; ADEGBOYE et al., 1995). Nestes países esta espécie é considerada uma das mais invasivas e causa alta mortalidade em bezerros. Outra espécie que tem sido diagnosticada em casos de mastite em bovinos é *M. bovirhinis*, esta foi detectada, através da PCR em 70% das amostras de leite de vacas com mastite (HIROSE et al., 2001). A transferência de micoplasmas presentes no trato respiratório e urogenital para glândula mamária, tem sido relatada para as espécies *M. californicum* e *M. canadense*, podendo ocorrer também nos casos de infecções por *M. bovis* (MACKIE et al., 2000).

Na literatura tem sido descrito que algumas espécies de micoplasmas restritas a caprinos podem ocasionalmente ser encontradas em bovinos, fato relatado para cepas de *M. mycoides* subsp. *capri* (OIE, 2008b). Nestes casos está espécie causa doença respiratória e artrite que se difunde rapidamente nos rebanhos (OIE, 2008b). De forma semelhante cepas de *MmmLC* (Y-goat) podem ser encontradas em bovinos assintomáticos para micoplasmoses (SANTOS et al., Prelo 2008). Em caprinos e ovinos, *MmmLC* causa uma síndrome clínica conhecida como “síndrome MAKEPS”, síndrome de mastite-artrite-keratoconjuntivite e pneumonia-septicemia, que resulta em sérias perdas econômicas em sistemas de produção (OIE, 2008b). Em cordeiros e cabritos esta cepa causa poliartrite aguda, septicemia e pleurite com alta mortalidade, enquanto nos animais adultos os sintomas são mastite e agalaxia (DaMASSA et al., 1992). A doença clínica produzida por *MmmLC* é semelhante à provocada por outras espécies de micoplasma como: *M. mycoides* subespécie *capri* (*Mmc*), *M. capricolum* subespécie *capricolum* (*Mcc*), *M. capricolum* subespécie *capripneumoniae* (*Mccp*), *M. agalactiae* etc, sendo difícil distinguir estas síndromes. Na Índia a circulação das cepas de *Mmc* e *MmmLC* tem dificultado a diferenciação destas cepas mesmo com técnicas moleculares (NAYAK; BHOWMIK, 1990; SINGH et al., 2004). Estes autores reportam que a mortalidade causada por *MmmLC* no país pode chegar a 25% nos animais adultos e 90% em cabritos. DaMASSA et al. (1992) mencionaram que *M. capricolum* também é um agente patogênico primário de caprinos, mas tem sido isolado de ovinos, vacas e Alpinos ibex (*Capra ibex ibex*). Em caprinos este agente é altamente patogênico, causando alta morbidade e mortalidade. Dentre os sinais clínicos destaca-se a severa poliartrite nas articulações diartrodial e septicemia. Estes autores relatam que *M. arginini* é uma espécie comum a bovinos, caprinos e ovinos, pode ser isolada de vários sítios de localização e normalmente não é patogênica. No entanto, tem sido isolada de casos de ceratoconjuntivite em ovinos.

Além das espécies citadas anteriormente, *M. conjunctivae* também pode ocorrer em bovinos. Esta espécie é freqüente em ovinos e caprinos, e eventualmente tem sido relatada em ruminantes selvagens na Europa. É mundialmente conhecida como agente etiológico da ceratoconjuntivite infecciosa ou “Infectious Keratoconjunctivitis Caprine” (IKC) ou “pink-eye”, doença contagiosa de pequenos ruminantes que ocorre em todo o mundo, e se caracteriza por lacrimejamento, hiperemia conjuntival, neovascularização, irites e ceratite. Além de *M. conjunctivae* outros microorganismos podem estar envolvidos nesta síndrome nos ovinos, destacando-se *Chlamydia psittaci*, *M. agalactiae*, *M. arginini* e *A. oculi* (RODRÍGUEZ et al., 1996; JANOVSKY et al., 2001). A patogenicidade do *M. conjunctivae* tem sido verificada em caprinos, ovinos e em ibex alpinos (*Capra i. ibex*) (GIACOMETTI et al., 1998), chamois Alpinos (*Rupicapra r. rupicapra*) (DEGIORGIS et al., 2000) e em mouflon (*Ovis orientalis musimon*) (TERRIER, 1998). As espécies ibex e chamois alpinos demonstraram ser susceptíveis a *M. conjunctivae*, inclusive com severa IKC (GIACOMETTI et al., 1998, 1999, 2002). IKC tem caráter sazonal com participação de insetos vetores. Estas observações foram descritas por Giacometti et al. (2002) em chamois alpinos (*Rupicara r. rupicapra*), onde 48% das infecções ocorrem durante o verão e outono. Tem sido demonstrado que ovinos saudáveis podem atuar como carreadores, e que a coabitação com Caprinae selvagens não é responsável pela manutenção da infecção (JANOVSKY et al., 2001). Em Israel casos de IKC tem sido registrados em ovinos, caprinos e Caprinae selvagens, nestes casos *M. conjunctivae* ocorre associada a *Chlamydia pecorum* com prevalências de 66,7% e 100%, respectivamente (LYSNYANSKY et al., 2007). Segundo estes autores IKC, em ovinos é uma doença emergente, e recentemente tem sido reconhecida como zoonose, devido ao contato de crianças com pequenos ruminantes domésticos.

No Brasil surtos de ceratoconjuntivite infecciosa causada por *M. conjunctivae* foram descritos em caprinos adultos em São Paulo (GREGORY et al., 2003, 2004), a taxa de morbidade nestes animais foi de 100% com alto índice de mortalidade. No Estado de Pernambuco *M. conjunctivae* foi isolado em ovinos com ceratoconjuntivite e em animais assintomáticos, a prevalência nos animais sadios foi de 15% e de 62,5% nos animais com ceratoconjuntivite (NETO et al., 2004). As perdas econômicas devido a IKC estão relacionadas, principalmente, aos custos com tratamento, longo tempo na recuperação dos animais doentes, além de perda da performance produtiva. Em bovinos, no Brasil, *M. conjunctivae* foi isolado do conduto auditivo de animais assintomáticos (SANTOS et al., Prelo, 2008). As informações sobre IKC nesta espécie animal no país inexistem e são necessários levantamentos sobre a situação deste agente como causa desta doença no país. Nos Estados Unidos a ceratoconjuntivite infecciosa bovina, conhecida como “Infectious Bovine Keratoconjunctivitis” (IBK) ou “pink-eye” afeta anualmente mais de dez milhões de bezerros com perdas econômicas estimadas em 150 milhões de dólares (HANSEN, 2001, citado por SNOWDER et al., 2005). Segundo Levisohn et al. (2004) IBK é a doença ocular mais importante em bovinos. Os principais agentes envolvidos nesta síndrome são *Moraxella bovis*, *M. bovis*, *M. conjunctivae* e *M. bovoculi*, os quais são responsáveis pelos surtos de IBK em bovinos adultos e em bezerros (ALBERTI et al., 2006). A patogenicidade da IBK é influenciada por muitos fatores como: época do ano, irrigação mecânica, resposta imune do hospedeiro, pigmentação do olho, presença de insetos vetores, raças dos animais e outros (LANGFORD; DORWARD, 1969; SNOWDER et al., 2005). De acordo com estes autores as raças mais afetadas são Hereford, Simmental, Charolais e MARC III e a ocorrência de IBK é maior no verão com aumento da incidência de moscas (*Musca autumnalis*).

No Brasil são poucos os estudos sobre as micoplasmoses dos bovinos, e é provável que estas infecções estejam subnotificadas. Neste contexto, pesquisas sobre micoplasmas no país estão restritas a levantamentos e identificação de surtos esporádicos. Micoplasmas têm sido diagnosticados em casos de mastite e agalaxia em rebanhos leiteiros, distúrbios reprodutivos em touros, vulvovaginite granular em bezerras e em problemas respiratórios (D'ANGELIS et al., 1994; METTIFOGO et al., 1996; NASCIMENTO et al., 1998; PRETTO et al., 2001; CARDOSO; VASCONCELOS, 2004; NASCIMENTO et al., 2005; OLIVEIRA FILHO et al., 2005; MARQUES et al., 2007; PETIT et al., 2008). No País as principais espécies descritas foram: *M. bovis*, *M. bovirhinis*, *M. canadense*, *M. bovigentialium*, *M. dispar*, *M. mycoides mycoides* LC, *M. capricolum*, *M. alkalescens*, *M. conjunctivae* e *M. arginini*. Estas espécies têm sido isoladas de diferentes sítios de localização e também secreções em animais sintomáticos e assintomáticos para micoplasmoses. Além destes estudos, recentemente, foram isoladas em conduto auditivo de bovinos assintomáticos para micoplasmose (SANTOS et al., Prelo 2008), as seguintes espécies: *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovirhinis*, *M. bovis*, *M. conjunctivae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. capricolum*. As perdas econômicas devido a infecções micoplásmicas em bovinos são relatadas em vários países e, no Brasil, estes dados ainda não foram levantados e pouco se sabe sobre os aspectos epidemiológicos destas infecções em bovinos.

Entre as espécies de micoplasmas que ocorrem, no Brasil, destaca-se *M. bovis*. Esta tem sido a espécie de maior importância sanitária para os rebanhos bovinos no país, devido às altas prevalências encontradas em rebanhos leiteiros causando problemas de mastite, agalaxia e pneumonias (GEVAERT, 2006; PRETTO et al., 2001; MARQUES et al., 2007). No Brasil *M. bovis* foi diagnosticado pela primeira vez por Rossini (1978) em bezerros com pneumonia em São Paulo. Em casos de mastite foi descrita inicialmente por Mettifogo et al. (1996) e a partir de então vem sendo relatada em várias regiões do país, de forma clínica e subclínica

principalmente em regiões de bacias leiteiras (PRETTO et al., 2001). Ressalta-se que além dos problemas de mastite nas vacas de raças leiteiras, *M. bovis* é responsável por pneumonias nos bezerros lactentes procedentes de vacas com mastite clínica ou subclínica (PRETTO et al., 2001). De acordo com pesquisadores esta espécie é considerada a mais freqüente e patogênica, em infecções da glândula mamária (BOOTHBY et al., 1996), sendo responsável por surtos esporádicos de alta contagiosidade. Segundo Mettifogo et al. (1996) a maioria dos surtos de mastite por micoplasmas é provocada por *M. bovis*, embora outras espécies também sejam isoladas nestes casos, tais como: *M. californicum*, *M. bovigenitalium*, *M. canadense*, *M. alkalescens*, *M. bovirhinis*, *M. arginini* e *Acholeplasma laidlawii*.

Em relação às doenças respiratórias causadas por micoplasmas em bovinos, Liberal et al. (1982) relataram o isolamento de *Mycoplasma* spp. em casos de pneumonia bovina no Estado do Rio de Janeiro. Em São Paulo, Marques et al. (2007) detectaram micoplasmas em bezerros saudáveis e com doença respiratória. Estes constataram que *M. bovis* ocorria em todos os animais com doença respiratória. *M. dispar* e *U. diversum* foram encontrados tanto em animais saudáveis quanto doentes, embora *M. dispar* tenha sido mais frequente em bezerros doentes. Semelhantemente, Ter Laak et al. (1992ab, 1993) verificaram que *M. dispar* e *U. diversum* são frequentemente isoladas de pulmões de bezerros doentes e sadios com prevalências altas.

No Brasil não existem registros de ocorrência de *MmmSC*, agente da CBPP. Em países livres de *MmmSC*, *M. bovis* é a principal causa de doenças respiratórias em bezerros na fase de lactação (TENK, 2005; GEVAERT, 2006; MARQUES et al., 2007). Cardoso et al. (2002) detectaram *M. bovis* em surtos de pneumonia enzoótica em bezerros em São Paulo. Neste complexo vários microorganismos atuam sinergicamente, destacando-se: *M. dispar*, *M. bovis*, *U. diversum*, *Pasteurella haemolytica* (*Mannheimia haemolytica*), *P. multocida*, *Haemophilus sommus*, vírus sincicial respiratório, vírus da parainfluenza 3 e herpesvírus bovino 1.

Em relação às espécies do Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM), no Brasil, os estudos são escassos, embora cepas de *MmmLC* e *M. capricolum* tenham sido isoladas em conduto auditivo de bovinos assintomáticos (SANTOS et al., Prelo 2008). Em caprinos, espécies deste grupo foram notificadas (NASCIMENTO et al., 1990; NASCIMENTO et al., 1986; RIBEIRO et al., 1995ab; BARBOSA et al., 2000) e são responsáveis por várias perdas econômicas em rebanhos de caprinos leiteiros, principalmente no nordeste e sudeste do país (NASCIMENTO et al., 1986; CASTRO et al., 1989; AZEVEDO et al., 2006). Em surtos de micoplasmoses nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, foram isolados *MmmLC* (anteriormente tido como agente da CCPP) e *M. mycoides* Subsp. *Capri* (NASCIMENTO et al., 1986; NASCIMENTO et al., 1990). E em caprinos de Nova Friburgo-RJ, Pereira et al. (2003), encontraram DNA de *M. mycoides mycoides* SC (*MmmSC*) em lavados de conduto auditivo de caprinos assintomáticos.

Em problemas reprodutivos em bovinos as principais espécies de micoplasmas e ureaplasmas isoladas são: *M. bovis*, *M. canadense*, *M. bovigenitalium*, *M. bovirhinis* e *U. diversum*. No trato genital de bovinos *M. bovirhinis* foi isolado pela primeira vez por Langford (1975, citado por GOULAY; STOTT, 1974), tanto em animais sadios quanto com problemas reprodutivos. *M. bovirhinis* também pode eventualmente ser isolado do trato respiratório de bovinos e no leite de vacas com mastite. A presença deste patógeno no sistema reprodutivo está associado a vulvovaginite granular, infertilidade, abortos, morte neonatal e síndrome de “weak calf” (MULIRA; SAUNDER, 1994). Em estudos realizados por D’Angelis et al. (1994) *Mycoplasma* spp. foi detectado com prevalência de 57% no trato genital de vacas com histórico de aborto e infertilidade. Nascimento et al. (1998) isolaram *M. bovirhinis* em muco vaginal de novilhas com prevalência de 22,9%. Estes autores destacaram

a importância desta espécie como causa de problemas reprodutivos nos bovinos do país e de provável diminuição da produção de leite e carne, a exemplo do que ocorre em outros países. Em 2005, Nascimento et al. diagnosticaram *M. bovis* em 57% das amostras de muco vaginal de vacas mestiças (Charolês-Nelore), com distúrbios reprodutivos (vulvovaginite, aborto, natimorto) e ressaltaram a importância da transmissão venérea por espécies que acometem o sistema reprodutivo dos bovinos, como *M. bovis*, *M. canadense* e *M. bovigenitalium*. Segundo Le Grand et al. (1995), *M. bovigenitalium* ocorre com prevalência de 60 a 100% nos touros com problemas reprodutivos. De acordo com Cardoso e Vasconcellos (2004) micoplasmas podem ser transferidos para vacas, através do sêmen contaminado causando infertilidade. Também referem que as perdas econômicas nas propriedades agropecuárias, devido a micoplasmas e ureaplasmas, resultam da diminuição do número de gestações, perdas fetais, partos prematuros, redução do número de serviços por animal, perdas na qualidade do sêmen, aumento dos custos com veterinários e medicamentos.

U. diversum tem sido relatado em todo mundo como causa de problemas reprodutivos em bovinos (BRITTON et al., 1987; ALBERTSEN, 1955; ONOVIRAN et al., 1975). As prevalências são acima de 70%, e segundo Britton et al. (1987) os principais distúrbios causados por ureaplasmas no trato reprodutivo são aborto, vesiculite seminal, epididimite, balanopostite, vulvite granular, metrite e morte embrionária, além de outras patologias responsáveis por alterações morfológicas e funcionais dos espermatozóides, como diminuição da motilidade resultando em baixa qualidade do sêmen. No Brasil o primeiro relato de *U. diversum* em bovinos foi feito por Cardoso et al. (1997) em muco vaginal de vacas com vulvovaginite granular (VVG) e em seguida foi diagnosticado em São Paulo por Cardoso et al. (2000). A presença de ureaplasmas no muco prepucial é alta, porém no prepúcio a sua presença não está associada a sinais clínicos (LE GRAND et al., 1995). Vianna et al. (2004) detectaram, através da PCR, a presença de *U. diversum* e *Histophilus somni*, como causa de infertilidade em touros, onde as culturas foram negativas. Cardoso et al., (2006) e Cardoso (2003) verificaram *M. bovigenitalium* e *U. diversum* em muco prepucial e sêmen de touros, as frequências encontradas foram de 56% para *M. bovigenitalium* e 85% para *U. diversum* em muco prepucial. Nas centrais de inseminação artificial foram encontradas frequências menores, 22% e 55%, para muco prepucial e sêmen, respectivamente. No sêmen a presença de *M. bovigenitalium* e *U. diversum*, em reprodutores a campo, foi de 35% e 76%, respectivamente, e, de 4% e 26% para reprodutores em central de inseminação artificial, respectivamente. Nos estados de São Paulo, Goiás e Santa Catarina, Buzinhani et al. (2007ab) detectaram *U. diversum* e *Mycoplasma* em vacas com distúrbios reprodutivos que tinham quadro de vulvovaginite. E, de acordo com Petit et al. (2008), a presença de *M. bovis*, *M. bovigenitalium*, *U. diversum* e Chlamydiaceae no trato genital de vacas leiteiras ocasiona vaginite, e determinam problemas de fertilidade.

1.2 Micoplasmas e ácaros de conduto auditivo de ruminantes

A microbiota do conduto auditivo de ruminantes é composta por uma ampla diversidade de microorganismos, dentre estes bactérias, fungos e protozoários. Muitos destes podem ser saprófitas ou comensais (BARBER et al., 1986; YATES et al., 1983; WOLDEHIWET et al., 1990; ALLEN et al., 1991, 1992; DUARTE; HAMDAN, 2004), enquanto outros são potencialmente patogênicos, e determinam problemas de otites e outras doenças que são disseminadas através desta via de infecção. Além de bactérias o conduto auditivo é também habitat de várias espécies de parasitos (ácaros, nematóides e larvas de

dípteros). Estes parasitos são agentes primários de otites, devido à irritação mecânica no canal auditivo e membrana timpânica, esta ação mecânica induz aumento na secreção de cerúmen favorecendo proliferação de bactérias e fungos (DUARTE et al., 2001ab; DUARTE; HAMDAN, 2004). Em associação, no conduto auditivo estes agentes parasitários e microbianos são responsáveis pelo complexo etiopatológico das otites externa, média e interna dos ruminantes.

Em artigo de revisão sobre as etiologias das otites em rebanhos bovinos Duarte et al. (2001ab) e Duarte e Hamdan (2004) relataram que a otite externa tem significativo impacto nas regiões subtropicais e tropicais, e os agentes predominantes são nematóides *Rhabditis* sp. e ácaros *Raillietia*. Na Europa, África, Índia e América outros parasitos que também estão envolvidos nos casos de otite são *Otobius megnini*, *Rhabditis bovis* e *Chrisomya bezziana*. A ocorrência de otite parasitária tem caráter sazonal nessas regiões, os altos níveis de infestações parasitárias, são atribuídas às altas temperaturas e umidade relativa do ar. Também as perdas econômicas neste âmbito se dão principalmente devido ao baixo desempenho dos animais, em razão da dor, estresse e mortes.

As otites externas em bovinos causadas por nematóides *Rhabditis* spp. são mais frequentes nas raças Gyr e Indubrasil (*Bos indicus*) e suas cruzas, a predisposição estaria associada à forma pendular da orelha, que favorece o crescimento e manutenção destes nematóides (LEITE et al., 1993, 1994; DUARTE et al., 2001a; DUARTE; HAMDAN, 2004). No Brasil, as taxas de prevalência para *Rhabditis* spp. variam de 60 a 90% em diferentes regiões do País, com relatos de ocorrência nos estados de Minas Gerais, Goiás, Rio de Janeiro, Distrito Federal e São Paulo (MARTINS et al., 1971; LEITE et al., 1993, 1994; DUARTE et al., 2001ab). Em associação com ácaros *Raillietia* spp. estes nematóides fazem parte do complexo etiológico de otite externa e média dos bovinos (DUARTE; HAMDAN, 2004).

A raillietiose é uma doença do conduto auditivo de ruminantes, causada por ácaros gamasídeos do gênero *Raillietia* spp. descrita há mais de cem anos atrás. Estes ácaros são parasitos do conduto auditivo externo e da superfície da membrana timpânica dos seus hospedeiros e possuem elevado potencial de disseminação, sendo responsáveis por determinar quadros de otite clínica e subclínica em ruminantes (LEITE et al., 1989; NUNES et al., 1975; JUBB et al., 1993; KRAMETTER-FROETSCHER et al., 2004). *Raillietia auris* tem distribuição cosmopolita e ocorre com frequência em rebanhos bovinos nos Estados Unidos, Europa, Austrália, Nigéria, Iran, Brasil e Áustria (NUNES et al., 1975; FACCINI et al., 1992b; KRAMETTER-FROETSCHER et al., 2004). No Brasil, *R. auris* foi descrita pela primeira vez por Nunes et al. (1972), em bovinos, e posteriormente Faccini et al. (1992a) descreveram uma outra espécie, *R. flechtmanni*, também em bovinos. Estes autores destacaram assim a carência de informações sobre a real prevalência destas duas espécies de *Raillietia* no país.

A prevalência para *Raillietia* spp. é reconhecidamente alta em várias regiões do País (FACCINI et al., 1992; REBOUÇAS et al., 1993; COSTA et al., 1992; FILHO et al., 1996), destacando-se as regiões sudeste e centro-oeste, com variações de 75 a 100% (FACCINI et al., 1992b). Nas regiões do norte e nordeste, informações sobre a ocorrência de raillietiose não encontradas. Em São Paulo Rebouças et al. (1993) relataram a presença de *R. flechtmanni* no conduto auditivo de búfalos. *Raillietia* spp. ocorre em maior frequência em rebanhos de corte das raças zebuínas (Nelore e Guzerá), com maior índice de parasitismo nos animais adultos (FILHO et al., 1996). A importância econômica desta ectoparasitose é incerta, mas em casos de otite externa e média os animais podem apresentar alterações patológicas, excesso de cerúmen, anorexia, emaciação, otorréia (NUNES et al., 1975) e em otites severas podem

ocorrer mortes (JUBB et al., 1993). Segundo alguns pesquisadores, as perdas econômicas neste âmbito se dão principalmente devido ao mau desempenho dos animais (NUNES et al., 1975; REBOUÇAS et al., 1993; COSTA et al., 1992; FILHO et al., 1996). Além das duas espécies descritas em bovinos, no Brasil existe uma outra espécie, *R. caprae*, que ocorre em caprinos na região sudeste do país (FACCINI et al., 1976; FONSECA, 1983; FONSECA et al., 1983; RIBEIRO et al., 1995b; FACCINI; RIBEIRO, 2008). Esta espécie ocorre em altas prevalências em rebanhos leiteiros da região sudeste, concomitante com *Psoroptes ovis*, causando um quadro de otocariase ou a forma subclínica em caprinos e ovinos (FACCINI et al., 1976; RIBEIRO et al., 1995b; FACCINI; RIBEIRO, 2008).

Estudos bacteriológicos mostram que otites causadas por ácaros gamasídeos e psoroptídeos estão associadas a uma ampla diversidade de bactérias, destacando-se *Mycoplasma* spp.. Estes mollicutes mantêm estreitas relações com ácaros, que por sua vez estão envolvidos na cadeia de transmissão de micoplasmose para ruminantes domésticos (DaMASSA, 1983, 1990; DaMASSA; BROOKS, 1991; DaMASSA et al., 1992; COTTEW; YEATS, 1981, 1982; RIBEIRO et al., 1995ab; GIL et al., 1999; FRANCOZ et al., 2004).

Micoplasmas e ácaros são comuns no conduto auditivo de ruminantes, sendo constituintes deste habitat, podendo ocorrer de forma saprófita ou patogênica (WHITCOMB; BOVÉ 1983; WHITFORD et al., 1994; DaMASSA, 1990; DaMASSA et al., 1992; FRANCOZ et al., 2004). Relatos da presença de ácaros e micoplasmas no conduto auditivo de ruminantes existem em vários países do mundo, tanto em animais clinicamente normais quanto em surtos de micoplasmoses (COTTEW; YEATS, 1981, 1982; DaMASSA 1983, 1990; DaMASSA et al., 1992; DaMASSA; BROOKS, 1991; RIBEIRO et al., 1995ab; GIL et al., 1999; FRANCOZ et al., 2004; MERCIER et al., 2007; SANTOS et al., Prelo, 2008). E, algumas espécies patogênicas de *Mycoplasma* spp. já foram isoladas do conduto auditivo de caprinos e bovinos assintomáticos para micoplasmoses (DaMASSA, 1983, 1990; COTTEW; YEATS, 1981, 1982; RIBEIRO et al., 1995ab; MERCIER et al., 2007; SANTOS et al., Prelo, 2008). Nos relatos de surtos de micoplasmoses as espécies isoladas foram as mesmas presentes no ouvido dos animais (WALZ et al., 1997; GIL et al., 1999; MAEDA et al., 2003; FRANCOZ et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; FOSTER et al., 2007; DYER et al., 2008).

Segundo DaMassa (1990) micoplasmas de condutos auditivo de caprinos estão associados com os ácaros *P. cuniculi* e *R. caprae* e evidências demonstram que micoplasmas podem ser transferidos entre caprinos através de ácaros (DaMASSA, 1983, 1990). Estes autores encontraram no conduto auditivo de caprinos clinicamente normais as seguintes espécies: *M. agalactiae*, *M. capricolum*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e *M. putrefasciens*, além de outras espécies não identificadas. Em bovinos assintomáticos, DaMassa (1983, 1990), isolou do conduto auditivo, as espécies *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. alkalescens*, *Mycoplasma* sp. sorogrupo 7 e *M. bovoculi*, e afirmou que o conduto auditivo é um sítio preferencial para isolamento de micoplasmas e que, possivelmente, existe uma relação entre a transferência de ácaros aos animais nos primeiros dias de vida, carreando micoplasmas de animais portadores a livres. DaMassa e Brooks (1991) e DaMassa (1983) verificaram uma prevalência de 95% para micoplasmas no conduto auditivo externo de caprinos. Estes autores encontraram prevalência de 34% para *P. cuniculi* e 74% para *R. caprae* em caprinos, enquanto *MmmLC* foi encontrado em 22% dos conduto auditivos examinados. Nos bovinos assintomáticos a prevalência de *M. bovoculi* foi de 19% no conduto auditivo dos animais com *R. auris*. Cottew e Yeats (1982) isolaram micoplasmas do nariz, boca, olhos, prepúcio, conduto auditivo externo e vagina de caprinos clinicamente normais. As principais espécies isoladas do conduto auditivo de caprinos foram *MmmLC*, *Mmc*, *M. agalactiae*, *M. capricolum* e *M. putrefasciens* que são potencialmente patogênicos

para essa espécie. Estes autores verificaram que as espécies de micoplasmas presentes nas criptas das tonsilas eram as mesmas encontradas no ouvido médio. Nesses animais também constatou-se a presença dos ácaros *P. cuniculi* e *R. caprae*. Nos ácaros *P. cuniculi* e *R. caprae*, Cottew (1985) isolou várias espécies de micoplasmas. Recentemente Mercier et al. (2007) investigaram a presença de micoplasmas em conduto auditivo de caprinos leiteiros na França e verificaram que micoplasmas deste local podem ser carreados de um rebanho a outro. Assim, afirmaram que a presença de ácaros gamasídeos, psoroptídeos e de micoplasmas patogênicos (*MmmLC*, *Mcc*, *Mp* e *Ma*) no conduto auditivo são um risco potencial aos rebanhos caprinos que podem atuar como carreadores de várias espécies de micoplasmas presentes no conduto auditivo. Segundo DaMassa e Brooks (1991) muitas questões ainda permanecem obscuras com relação a ocorrência de micoplasmas em conduto auditivo, mas algumas peculiaridades deste local podem favorecer a persistência destes agentes, como menos efetividade do sistema imune neste sítio, além de maior acúmulo de cera que oferece proteção osmótica para a sobrevivência de micoplasmas.

No Brasil Ribeiro et al. (1995ab) encontraram prevalência de 88,9% para *R. caprae* em caprinos leiteiros e estes ácaros continham micoplasmas, com prevalência de 81,9%. As espécies de micoplasmas identificadas foram *M. mycoides*, espécie patogênica para caprinos e *M. arginini*, considerado apatogênico. Utilizando imunofluorescência Ribeiro et al. (1995a) tipificaram as seguintes espécies em conduto auditivo de caprinos: *Mmc* e *MmmSC*. Em outros trabalhos a presença de *M. agalactiae*, isolado em conduto auditivo de caprinos, foi associado a surtos de agalaxia contagiosa (ACCO), sendo especulado que este sítio pode atuar como fonte de infecções clínicas (DaMASSA, 1983; HAZELL et al., 1985, 1986; GIL et al., 1999; AZEVEDO et al., 2006; TARDY et al., 2007). A prevalência média de micoplasmas em conduto auditivo de caprinos varia com diferentes pesquisas: 29% (0-100%) para Cottew e Yeats (1982), 19% (0-69%) para DaMassa (1983), e 37% (20-75%) para Gil et al., (1999). No nordeste do Brasil a presença de micoplasmas em conduto auditivo de caprinos tem sido associada a surtos de doenças nos animais (AZEVEDO et al., 2006) e ácaros *P. cuniculi* podem estar envolvidos na disseminação de micoplasmas entre os caprinos desta região. Estes ácaros ocorrem em altas prevalências no sertão nordestino, inclusive determinando casos de otite clínica e subclínica (PADILHA; FACCINI, 1982; SANTOS; FACCINI, 1996), *R. caprae* não tem sido encontrada em animais da região. No sudeste do Brasil duas espécies de ácaros podem estar envolvidas na disseminação de micoplasmas entre rebanhos caprinos, *R. caprae* e *P. cuniculi* (RIBEIRO et al., 1995; RIBEIRO et al., 1997), sendo *R. caprae* de maior importância epidemiológica nesta região, devido a alta prevalência.

Em bovinos a presença de micoplasmas no conduto auditivo está freqüentemente associada à otite externa, média e interna bem como a pneumonias, mastites, agalaxia, poliartrite e septicemias. Nestes achados a espécie *M. bovis* tem sido a mais comumente isolada, tanto no conduto auditivo dos bovinos quanto nos surtos de micoplasmoses destes animais (FRANCOZ et al., 2004). Estes casos têm sido relatados em diferentes países de mundo, tanto em regiões de clima tropical quanto em regiões temperadas, ocorrendo em animais de diferentes idades e raças. De acordo com Jensen et al. (1983), Walz et al. (1997), Yeruham et al. (1999) e Foster et al. (2007) em surtos de otite média por *M. bovis* os sintomas observados são: descarga purulenta, cabeça inclinada, ptose, paresia ou paralisia, ataxia, Síndrome de Horner's, estrabismo e convulsões. Associada a este tipo de otite são comuns a ocorrência de pneumonia, artrite séptica, diarreia e infecção umbilical. Em alguns animais podem ocorrer sinais de inflamação do SNC, doença vestibular periférica e disfunção do nervo facial.

Segundo Woldehiwet et al. (1990) e Walz et al. (1997) *M. bovis* pode ser encontrado como comensal do trato respiratório, ocorrendo em bovinos sem causar doença. E, possivelmente existem fatores que favorecem o desenvolvimento da doença como número de microrganismos infectantes presentes no leite ingerido e condições sanitárias inadequadas. Nos Estados Unidos (Michigan) *M. bovis* está relacionado a casos de otite média em bezerras na época do desmame (WALZ et al., 1997; MAEDA et al., 2003; FRANCOZ et al., 2004; FOSTER et al., 2007), sendo encontrado na cavidade timpânica, seios frontais, pulmões e leite dos animais examinados. De acordo com Francoz et al. (2004) surtos de otite média por *M. bovis* podem acometer bezerras antes e após o desmame em rebanhos de corte e de leite, sendo estas últimas mais predisponentes. Nestes casos as otites podem resultar de uma extensão de otite externa, pela colonização da tuba auditiva ou devido a uma bacteremia. A morbidade pode variar de 1 a 80%, sendo mais alta nas bezerras confinadas. Segundo Francoz et al. (2004) e Walz et al. (1997) os bezerros se infectam durante a ingestão de colostro proveniente de vacas com mastite subclínica. Assim, mastite subclínica pode atuar como um fator de risco para desenvolvimento de otite média e pneumonias em bezerros nesta fase, e a transmissão de *M. bovis* ocorre durante a alimentação, quando este atinge as vias aéreas superiores e inferiores dos animais. De acordo com Pfitzner e Sachse (1996) é pouco provável que bezerros com *M. bovis* não desenvolvam sinais clínicos, entretanto, alguns autores relatam uma prevalência de 30% de animais portadores. Segundo Jensen et al. (1983) a presença de otite média pode ser um fator de risco para ocorrência de surtos de infecções respiratórias agudas em bezerros. Lamm et al. (2004) referem que otites micoplásmicas tem um caráter sazonal, aumentando na primavera e baixando no verão e a probabilidade de animais com otites desenvolverem pneumonias é alta. Observações semelhantes foram feitas por Yercham et al. (1999), que verificaram alta morbidade de otite média durante as épocas de parição, nos meses de outono e do inverno (outubro-dezembro). Estes autores encontraram prevalências de 21,8 a 87,5%, sendo esta última em bezerros (Israel-Holstein) com três a oito semanas de idade. Outros agentes isolados nestes casos foram: *Pasteurella haemolytica* (32,8%), *P. multocida* de (31,2%), *Actinomyces pyogenes* (17,2%) e *Streptococcus pneumoniae* (4,7%). A patogênese dessas infecções é incerta, mas é provável que infecções da faringe, através da Trompa de Eustáquio, atinjam o ouvido médio ou também podem ocorrer como resultado de otite externa ou interna que se estende até o ouvido médio (YERCHAM et al., 1999). Além de *M. bovis*, outras bactérias podem ser encontradas em casos de otite e em pneumonias em bezerros (WALZ et al., 1997; FRANCOZ et al., 2004; DUARTE et al., 2001ab; DUARTE et al., 2004; FOSTER et al., 2007) destacando-se *Actinomyces* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus sommus*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *Malassezia pachydermatis*. Em alguns casos, dependendo da severidade das infecções pode ocorrer meningite e morte.

Encontram-se descritas na literatura várias associações de surtos de otite média com pneumonia em bezerros (MAEDA et al., 2003; FOSTER et al., 2007; DYER et al., 2008). Neste contexto, Maeda et al. (2003) relataram um surto de otite média e pneumonia em bezerros de corte e estimaram uma morbidade em torno de 40% e uma mortalidade de 100%. Neste surto, estes pesquisadores isolaram *M. bovis* da cavidade nasal, conduto auditivo, pulmões, linfonodos, cérebro e coração de todos os bezerros. Através de análises ultra-estruturais esses autores demonstraram que este era altamente invasivo, sendo encontrado dentro de células de diferentes linhagens. Para *M. bovis*, são vários os relatos de sua distribuição e invasão nas células e tecidos do organismo de bovinos (THOMAS et al., 1986; THOMAS et al., 1987; ADEGBOYE et al., 1995; RODRIGUEZ et al., 1996). Esta

localização intracitoplasmática ocorre em várias outras espécies de micoplasmas (*M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. penetrans* e *M. pneumoniae*), sendo encontradas no citoplasma de hepatócitos em pacientes com AIDS (LO et al., 1989). Localizações intracelulares são favoráveis para evasão das respostas imune dos hospedeiros (RAZIN et al., 1998; BLANCHARD; BROWNING, 2005). Em estudo recente Dyer et al. (2008) isolaram *M. bovis* de um surto de pneumonia caseonecrótica em bezerros. Este estava presente em abscessos pulmonares e lesões da nasofaringe. Além de pneumonia, estes animais apresentaram poliartrite, laringite, inchaço articular, laminite e relutância a locomoção, bem como perda gradual da condição corporal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras e procedimentos para isolamento de *Mycoplasma* spp. em conduto auditivo de bovinos

As coletas foram realizadas em abatedouro frigorífico localizado na cidade de Barra Mansa-RJ. Região caracterizada por clima tropical úmido, com precipitação anual de 1200mm³, umidades que variam de 70-90%, temperaturas de 24-30°C e com altitudes variando de 26 a 407m. Área com exploração agrosilvopastoril, onde se destaca a pecuária de corte, predominando raças zebuínas. Neste abatedouro são recebidos animais de diversos municípios que abrangem a região sudeste do Estado do Rio de Janeiro, dentre eles Resende, Barra do Piraí, Três Rios, Volta Redonda, Valença, Itaguaí, Seropédica e Rio de Janeiro.

No período de março a abril de 2006 foram realizadas lavagens, de forma aleatória, nos condutos auditivos de 60 bovinos por ocasião do abate, sendo lavado um conduto auditivo por animal. Os bovinos eram de ambos os sexos, adultos e mestiços de raças zebuínas variadas. Para lavagem dos condutos auditivos utilizou-se uma solução salina tamponada (PBS, pH 7,2) disposta em seringas estéreis de 60mL com sonda plástica acoplada (10cm). Cada conduto auditivo foi lavado com 120mL de PBS, dividido em duas alíquotas de 60mL. Do conteúdo instilado recuperava-se um volume de aproximadamente 30-40mL. Após a coleta, as amostras foram transportadas em caixa isotérmica com gelo, sendo posteriormente, no laboratório, armazenadas em glicerol (1:2) e congeladas a -20°C até o uso. Para o isolamento de *Mycoplasma* spp. foram realizadas diluições decimais seriadas das amostras até 10⁻⁵, ou até 10⁻⁷⁻¹⁰, sendo então semeadas em meio Hayflick's modificado, sólido e em 2mL desse meio líquido, específico para isolamento de micoplasmas. As placas e os caldos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C, em dessecador sob microaerofilia e examinadas a cada 48 horas, para visualização de colônias características em forma "ovo-frito" em microscópio estereoscópio (40x). As amostras em meio sólido, sem crescimento, foram observadas por um período de 20 dias, sendo então descartadas.

A confirmação do isolamento do gênero *Mycoplasma* spp. nas amostras com presença de "ovo-frito" baseou-se nas provas de Dienes e digitonina (WHITFORD et al., 1994). Após realização das provas de Dienes e digitonina, para confirmação de classe e gênero, também foram observadas características fisiológicas e bioquímicas tais como: fermentação de glicose, hidrólise arginina, formação de filmes e manchas, atividade de fosfatase, prova de uréase descritas por Razin e Tully (1983) e Whitford et al. (1994), sendo estes resultados das provas bioquímicas utilizados para direcionar a tipificação pela imunoperoxidase (Quadro 1). Os cultivos positivos foram mantidos através de repiques a cada 48 horas. Algumas amostras com diversidade morfológica, no tamanho das colônias, foram clonadas de acordo com protocolo descrito em Razin e Tully (1983), antes de serem submetidas à tipificação. As cepas isoladas e cultivadas em meio líquido foram estocadas em glicerol para uso posterior de acordo com Nascimento e Nascimento (1984).

2.2 Processamento de ácaros do gênero *Railletia* spp. para isolamento de *Mycoplasma* spp.

Os ácaros coletados nos lavados de conduto auditivo foram separados, contados, sexados e processados para isolamento de *Mycoplasma* spp. Os espécimes foram manipulados com estiletos entomológicos estéreis, sendo visualizados em microscópio estereoscópio (40-100X) no fluxo laminar. Cada amostra de lavado de ouvido e de ácaro foi processada separadamente por animal. Os ácaros de cada amostra foram lavados cinco vezes em 1 mL de meio Hayflick modificado, utilizando-se para isto um vórtex (Phoenix, At 56), de acordo com protocolo demonstrado por Cottew e Yeats (1982), DaMassa e Brooks (1991), Ribeiro et al. (1995b). As últimas lavagens dos ácaros, 5^a ou 7^a, foram semeadas em meio líquido e sólido, visando com isso a partir destas, determinar o número de microorganismos presentes na exocutícula antes do macerado dos ácaros. Em seguida, as fêmeas foram seccionadas numa linha imaginária entre o final do podossoma e a porção anterior do opistossoma, em placas de petri e com auxílio de estilete entomológico estéril e microscópio estereoscópio. O opistossoma foi macerado e processado para isolamento de micoplasmas de acordo com procedimento descrito no item anterior. A porção podossomal foi armazenada em álcool etílico a 70% e posteriormente montada em Hoyer's, segundo técnicas padronizadas na Acarologia (FLECHTMANN, 1977), visando com isso separar as fêmeas das espécies *R. auris* e *R. flechtmani* que são encontradas parasitando o conduto auditivo de bovinos no Brasil. Os machos de *R. auris* e *R. flechtmani* foram identificados e submetidos aos mesmos procedimentos de isolamento adotado para as fêmeas. A identificação dos espécimes foi realizada segundo Faccini et al. (1992).

2.3. Tipificação das espécies de *Mycoplasma* spp. isoladas de conduto auditivo de bovinos e de ácaros do gênero *Railletia* spp.

2.3.1 Imunoperoxidase Indireta

A tipificação das espécies de micoplasmas isoladas de conduto auditivo de bovinos e dos ácaros foi feita pelo teste de imunoperoxidase indireta segundo técnica preconizada por Imada et al. (1987). No teste de imunoperoxidase indireta foram utilizados nove anti-soros específicos para cada espécie de micoplasma, a saber: *M. arginini* (GM440), *M. bovis* (Doneta), *M. conjunctivae* (HRC581), *M. mycoides mycoides*-LC (Y goat), *M. bovirhinis* (PG43), *M. alkalescens* (GM352), *M. capricolum* (Califórnia Kid, GM719), *M. verecundum* (GM893) e *M. gallisepticum* (GM955). Os anti-soros foram diluídos na proporção de 1:20 ou na ocorrência de reações cruzadas este era usado na diluição 1:40. O conjugado utilizado foi IgG de cabra anti IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma[®]) na diluição de 1:80 e 1:120. As placas foram incubadas com os anti-soros "overnight" a 5°C e a leitura realizada em microscópio estereoscópio (4x) no mesmo dia, após a revelação. No controle da reação foram utilizadas amostras de referência de *Mycoplasma gallisepticum* MGR-American type culture collection (ATCC) e *M. agalactiae* (Califórnia kid, AJD GM 719). As reações foram classificadas nos seguintes graus: negativa (sem mudança de coloração das colônias de amareladas para violeta) (-), fraca (+), moderada (+++), forte (++++), e muito forte (+++++), a leitura dos resultados obedeceu a um critério de duplo cego (PEREIRA, 2003).

2.4 Análise estatística

Para verificar associação entre a presença de micoplasmas no conduto auditivo externo de bovinos e nos ácaros, utilizou-se o teste do qui-quadrado, bem como para verificar diferenças na prevalência do isolamento de micoplasmas nas espécies *R. auris* e *R. flechtmani* de acordo com Sampaio (2002).

Quadro 1. Principais características bioquímicas e fisiológicas utilizadas na diferenciação das espécies de *Mollicutes* encontradas em ruminantes. Fonte: Dados obtidos e adaptados de Whitford et al. (1994), Razin e Tully (1983) e Nicholas e Ayling (2003).

| Microorganismo | Abreviatura usada | Hospedeiro principal | Característica bioquímica e fisiológica | | | | | | |
|---|-------------------|---------------------------|---|----|----|-----|----|----|----|
| | | | F | HA | OG | AP | SD | FM | AU |
| <i>M. arginini</i> | - | Bovino | - | + | - | - | + | - | - |
| <i>M. alkalescens</i> | - | Bovino | - | + | - | - | + | - | - |
| <i>M. bovirhinis</i> | - | Bovino | +/- | - | + | +/- | + | - | - |
| <i>M. bovigenitalium</i> | - | Bovino | + | - | - | - | + | + | - |
| <i>M. bovoculi</i> | - | Bovino | +/- | - | + | - | + | + | - |
| <i>M. bovis</i> | - | Bovino | + | - | - | - | + | + | - |
| <i>M. conjunctivae</i> | - | Caprino/ovino/ bovino | - | - | + | - | + | + | - |
| <i>M. californicum</i> | - | Bovino | + | - | - | D | + | - | - |
| <i>M. canadense</i> | - | Bovino | -* | + | - | D | + | - | - |
| <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> | <i>Mcc</i> | Caprino/ovino | - | + | + | + | + | - | - |
| <i>M. dispar</i> | - | Bovino | - | - | + | D | + | - | - |
| <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC | <i>MmmSC</i> | Bovino/caprino* | - | - | + | - | + | - | - |
| <i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC | <i>MmmLC</i> | Caprino/ovino/ bovino* | - | - | + | + | + | - | - |
| <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> | <i>Mmc</i> | Caprino/ovino/ bovino* | - | - | + | + | + | - | - |
| <i>M. verecundum</i> | - | Bovino | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>Ureaplasma diversum</i> | - | Bovino | - | - | - | - | + | - | + |
| <i>Acholeplasma</i> spp | - | Bovino/caprino/ ovino | - | - | + | + | - | - | - |

Hidrólise da arginina (HA); fermentação glicose (FG); atividade proteolítica (AP); sensibilidade à digitonina (SD), formação de “filmes e manchas” (FM); atividade de urease (AU); fosfatase (F); desconhecido (D); fraco (-*); *Ocorre raramente nesta espécie.

3 RESULTADOS

3.1 Animais e fatores epidemiológicos

Nos bovinos utilizados foi observada a presença de ectoparasitos (ácaros e larvas de moscas) além de nematóides. Constatou-se a presença de exudato e excessiva quantidade de cerume, que são freqüentes em casos de otite clínica e subclínica. Durante a lavagem dos condutos auditivos observou-se intenso parasitismo pelo gênero *Raillietia* spp.. Também em alguns animais, eventualmente, observou-se a presença de nematóides *Rhabditis* spp.

3.2 Isolamento de micoplasmas em conduto auditivo de bovinos

Nas 60 amostras de lavados de conduto auditivo de bovinos a prevalência de *Mycoplasma* spp. foi de 80% (48/60), cujos isolados foram positivos nos testes de Dienes e digitonina, excluindo-se a possibilidade de isolamento de mollicutes não dependentes de colesterol a exemplo dos *Acholeplasma* spp. considerados dentre os mollicutes como saprófitas. As colônias de micoplasma típicas em forma de “ovo frito” podem ser visualizadas na Figura 1A. Dos 48 isolados de *Mycoplasma* spp., 83% (40/48) fermentaram glicose e 14,6% (7/48) hidrolisaram arginina. Das amostras de lavado de conduto auditivo apenas 20% (12/60) foram negativas para membros da classe *Mollicutes*.

Na tipificação pela imunoperoxidase indireta (Figura 1B), as espécies de micoplasmas isoladas nos lavados de condutos auditivo de bovinos foram: *M. alkalescens* 12,5% (6/48), *M. arginini* 2,1% (1/48), *M. bovirhinis* 8,3% (4/48), *M. bovis* 2,1 (1/48), *M. conjunctivae* 25% (12/48), *M. mycoides mycoides* LC 14,6% (7/48) e *M. capricolum* 10,4% (5/48) (Tabela 1). Em 25% (12/48) dos cultivos só foi possível tipificar até gênero, *Mycoplasma* spp.. As cepas de *Mmm*LC foram identificadas por uma reação muito forte na imunoperoxidase indireta (+++++), bem como as cepas de *M. conjunctivae* (+++++). As demais amostras foram classificadas como moderada (+++). Na Tabela 2, está demonstrado a frequência de infecções mistas por diferentes espécies de micoplasmas. Em 2,1% dos animais encontrou-se *M. alkalescens*+*M. bovirhinis*, *M. conjunctivae* + *M. arginini*+ *Mycoplasma* spp. (2,1%), *M. conjunctivae* + *M. alkalescens*+ *Mycoplasma* spp.(2,1%), *M.capricolum* + *M. alkalescens*+ *Mycoplasma* spp.(2,1%), *Mmm* LC (Y-goat) + *M. conjunctivae*+ *Mycoplasma* spp. (8,3%), *M.capricolum*+ *M. conjunctivae*+ *Mycoplasma* spp.(4,2%), *Mmm* LC (Y-goat) + *M. conjunctivae*+ *M. alkalescens*+ *Mycoplasma* spp. (2,1%), *M.capricolum* +*M.bovirhinis*+ *M. alkalescens*+ *Mycoplasma* spp.(4,2%).

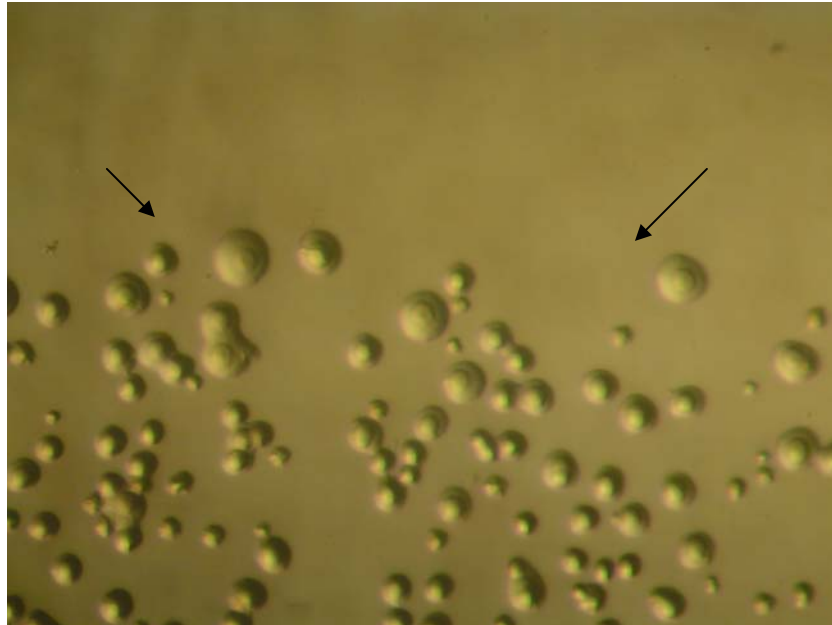


Figura 1A. Colônias de *Mycoplasma* spp. em forma típica de “ovo frito” observadas em microscópio estereoscópio (40X).

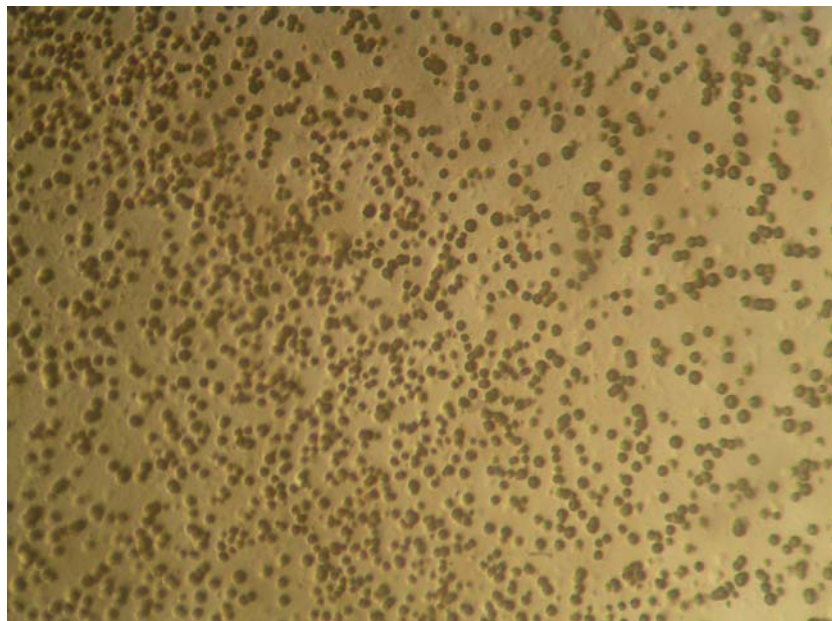


Figura 1B. Colônias de *M. mycoides mycoides* LC (Y-goat), tipificadas pela reação da imunoperoxidase indireta, isolados de conduto auditivo de bovinos (40X).

Tabela 1. Frequência das espécies de *Mycoplasma* sp. isoladas em conduto auditivo de bovinos de abate, do sudeste do Estado do Rio de Janeiro, tipificados pela técnica de imunoperoxidase indireta.

| Espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. | Lavados de ouvido | | |
|---|-------------------|------|-------|
| | N ^o | (%) | Total |
| <i>Mycoplasma</i> spp. | 12 | 25 | 48 |
| <i>M. alkalescens</i> | 6 | 12,5 | 48 |
| <i>M. arginini</i> | 1 | 2,1 | 48 |
| <i>M. bovirhinis</i> | 4 | 8,3 | 48 |
| <i>M. bovis</i> | 1 | 2,1 | 48 |
| <i>M. conjunctivae</i> | 12 | 25,0 | 48 |
| <i>M. capricolum</i> | 5 | 10,4 | 48 |
| <i>M. mycoides mycoides</i> LC (Y-goat) | 7 | 14,6 | 48 |

Tabela 2. Frequência de co-infecção das espécies de *Mycoplasma* spp. encontradas no conduto auditivo de bovinos de abate, do Estado do Rio de Janeiro.

| Espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. | Animais positivos | | |
|--|-------------------|-----|-------|
| | (N ^o) | (%) | Total |
| <i>M. alkalescens</i> + <i>M. bovirhinis</i> | 1 | 2,1 | 48 |
| <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. arginini</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. | 1 | 2,1 | 48 |
| <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. alkalescens</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. | 1 | 2,1 | 48 |
| <i>M. capricolum</i> + <i>M. alkalescens</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. | 1 | 2,1 | 48 |
| Mmm LC (Y-goat) + <i>M. conjunctivae</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. | 4 | 8,3 | 48 |
| <i>M. capricolum</i> + <i>M. conjunctivae</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. | 2 | 4,2 | 48 |
| Mmm LC (Y-goat) + <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. alkalescens</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. | 1 | 2,1 | 48 |
| <i>M. capricolum</i> + <i>M. bovirhinis</i> + <i>M. alkalescens</i> + <i>Mycoplasma</i> spp. | 2 | 4,2 | 48 |

Nos lavados de conduto auditivo de bovinos verificou-se alta prevalência para ácaros do gênero *Raillietia* spp. 76,7% (46/60) (Figura 2). Na análise da relação entre a presença de micoplasmas e ácaros no conduto auditivo verificou-se que, de 54 lavados de ouvidos positivos para qualquer um destes parasitos, em 40 animais (74,1%), estavam presentes tanto *Raillietia* quanto *Mycoplasma*, a associação entre estes dois agentes no conduto auditivo foi altamente significativa ($p < 0,001$). Em seis animais foi verificado somente parasitismo por *Raillietia* (11,1%) e em oito (14,8%) somente por *Mycoplasma* (Tabela 3). Dos animais estudados 10% (6/60), foram negativos tanto para ácaros quanto para micoplasmas.



Figura 2. Ácaro do gênero *Raillietia* spp. isolado de conduto auditivo de bovinos de abate, Rio de Janeiro, Brasil.

Tabela 3. Relação entre a ocorrência de ácaros *Raillietia* spp. e *Mycoplasma* spp. no conduto auditivo de bovinos de abate.

| Parasitas do conduto auditivo | Lavados de ouvido de Bovinos | |
|---------------------------------------|------------------------------|-----------|
| | Positivos | Negativos |
| <i>Raillietia</i> + <i>Mycoplasma</i> | 40 (74,1) | 14 (12,9) |
| <i>Raillietia</i> spp. | 6 (11,1) | 48 (44,4) |
| <i>Mycoplasma</i> spp. | 8 (14,8) | 46 (42,6) |
| Total | 54 | 108 |

*X²: p<0,001 *Na análise estatística considerou-se um n=54 (presença de um ou dos dois agentes testados).

3.3 Presença de *Mycoplasma* sp. e ácaros *R. auris* e *R. flechtmanni* no conduto auditivo de bovinos

Dos 284 ácaros coletados, a intensidade de infestação por animal variou de um a 31 ácaros. Em 218 ácaros processados para isolamento de *Mycoplasma* spp., foram identificados 193 fêmeas (88,5%) e 25 machos (11,5%). A relação observada de fêmea:macho foi de 7,7 (193:25). A prevalência de *Mycoplasma* spp. nos ácaros do gênero *Raillietia* spp. foi de 81,2% (177/218). Esta frequência após análise com teste do qui-quadrado como teste de aderência e admitindo-se a proporção de 1:1 para ácaros positivos e negativos para *Mycoplasma* spp. encontrou-se valor altamente significativo (p<0,001) (Tabela 4).

Tabela 4. Frequência da associação de *Mycoplasma* no interior de ácaros *Raillietia* spp. em isolados de bovinos de abate.

| Macerado do ácaro | Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp. |
|-------------------|-----------------------------------|
| Positivo | 177 (81,2%) |
| Negativo | 41 (18,8%) |
| Total | 218 (100%) |

*X²: p<0,001, *considerando teste de aderência e proporção (1:1)

Na identificação microscópica das fêmeas do gênero *Raillietia* verificou-se que 52,3% (101/193) foram da espécie *R. auris* e 47,7% (92/193) foram *R. flechtmanni*. No isolamento de micoplasmas nas fêmeas de *R. auris* a prevalência destes mollicutes foi de 75,2% (76/101) e em *R. flechtmanni* de 88% (81/92). Na análise estatística esta diferença foi significativa ($P < 0,05$) (Tabela 5). Devido aos danos ocasionados às fêmeas durante os procedimentos de secção e montagem, inferiu-se na prevalência destas duas espécies um erro estimado de 20%, entretanto é provável que este erro não interfira na prevalência real destas duas espécies na natureza, uma vez que ambas ocorreram em proporções aproximadas.

Dos ácaros machos processados, 56% (14/25) eram da espécie *R. auris* e 44% (11/25) eram *R. flechtmanni*. A prevalência de micoplasmas nos machos de *R. auris* foi de 78,6% (11/14) e em machos de *R. flechtmanni* foi de 81,8% (9/11), esta frequência de isolamento não foi significativa entre os machos das duas espécies ($p > 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 5. Frequência de *Mycoplasma* spp. em fêmeas de *R. auris* e *R. flechtmanni* parasitas de conduto auditivo de bovinos de abate, do sudeste do Estado do Rio de Janeiro.

| Espécies de ácaros | <i>Mycoplasma</i> spp. | | |
|-----------------------|------------------------|-----------|-----------|
| | Positivo | Negativos | Total |
| <i>R. auris</i> | 76 (75,2) | 25(24,8) | 101(52,3) |
| <i>R. flechtmanni</i> | 81 (88,0) | 11(11,9) | 92 (47,7) |
| Total | 157(81,3) | 36(18,7) | 193 |

X^2 : $p < 0,05$

Tabela 6. Frequência de *Mycoplasma* spp. em machos de *R. auris* e *R. flechtmanni* parasitas de conduto auditivo de bovinos de abate, do sudeste do Estado do Rio de Janeiro.

| Espécies de ácaros | <i>Mycoplasma</i> spp. | | |
|-----------------------|------------------------|-----------|-----------|
| | Positivo | Negativos | Total |
| <i>R. auris</i> | 11 (78,6) | 3 (21,4) | 14 (56,0) |
| <i>R. flechtmanni</i> | 9 (81,8) | 2 (18,2) | 11 (44,0) |
| Total | 20 (80,0) | 5 (20,0) | 25 |

X^2 : $p > 0,05$

As principais espécies de *Mycoplasma* identificadas no teste de imunoperoxidase indireta em *R. auris* foram: *M. alkalescens* 6,9%, *M. arginini* 3,4%, *M. bovirhinis* 9,2%, *M. conjunctivae* 18,4%, *M. mycoides mycoides* LC 8,0%, *M. capricolum* 5,7%. Na espécie *R. flechtmani* a prevalência foi de *M. alkalescens* 12,2%, *M. arginini* 1,0%, *M. bovirhinis* 18,9%, *M. bovis* 2,2%, *M. conjunctivae* 21,0%, *M. mycoides mycoides* LC 11,0% e *M. capricolum* 4,4% (Tabela 7). Na Tabela 8, estão demonstradas as espécies de *Mycoplasma* que ocorreram em coinfeção em ácaros do gênero *Raillietia* spp.

Nos ácaros processados para isolamento de *Mycoplasma* verificou-se que em 164 ácaros não houve crescimento na 5ª lavagem, mas após o macerado destes espécimes foram isolados *Mycoplasma* spp. em contagens microbianas que variaram de 10^3 até 10^7 UFC/mL. Enquanto que em 54 ácaros, na 5ª lavagem dos ácaros, foram isolados micoplasmas com contagem microbiana até 10^3 UFC/mL e após macerado destes a contagem variou de 10^3 até contagens acima de 10^7 (Tabela 9).

Tabela 7. Espécies de *Mycoplasma* isoladas de ácaros *R. auris* e *R. flechtmani*, coletados de conduto auditivo de bovinos de abate.

| Espécie de <i>Mycoplasma</i> | Espécie de ácaro | | | |
|--------------------------------------|------------------|------|----------------------|------|
| | <i>R. auris</i> | | <i>R. flechtmani</i> | |
| | (Nº) | (%) | (Nº) | (%) |
| <i>M. alkalescens</i> | 6 | 6,9 | 11 | 12,2 |
| <i>M. arginini</i> | 3 | 3,4 | 1 | 1,0 |
| <i>M. bovirhinis</i> | 8 | 9,2 | 17 | 18,9 |
| <i>M. bovis</i> | 0 | 0 | 2 | 2,2 |
| <i>M. conjunctivae</i> | 16 | 18,4 | 19 | 21,0 |
| <i>M. capricolum</i> | 5 | 5,7 | 4 | 4,4 |
| <i>M. mycoides mycoides</i> (Y-goat) | 7 | 8,0 | 10 | 11,0 |

Tabela 8. Frequência de co-infecção das espécies de *Mycoplasma* spp. encontradas em ácaros *Raillietia* spp.

| Espécies de <i>Mycoplasma</i> | <i>Raillietia</i> spp. (+) | | |
|---|----------------------------|------|-------|
| | (N ^o) | (%) | Total |
| <i>M. bovirhinis</i> + <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. alkalescens</i> | 3 | 1,7 | 177 |
| <i>MmmLC</i> + <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. bovirhinis</i> | 3 | 1,7 | 177 |
| <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. capricolum</i> + <i>M. bovirhinis</i> | 1 | 0,5 | 177 |
| <i>MmmLC</i> + <i>M. alkalescens</i> + <i>M. conjunctivae</i> | 1 | 0,5 | 177 |
| <i>MmmLC</i> + <i>M. alkalescens</i> + <i>M. bovirhinis</i> | 1 | 0,5 | 177 |
| <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. arginini</i> + <i>M. alkalescens</i> | 1 | 0,5 | 177 |
| <i>M. arginini</i> + <i>M. bovirhinis</i> + <i>MmmLC</i> + <i>M. conjunctivae</i> | 1 | 0,5 | 177 |
| <i>M. bovirhinis</i> + <i>M. alkalescens</i> | 3 | 1,7 | 177 |
| <i>M. arginini</i> + <i>M. bovis</i> | 1 | 0,5 | 177 |
| <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. alkalescens</i> | 2 | 1,0 | 177 |
| <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. capricolum</i> | 2 | 1,0 | 177 |
| <i>M. conjunctivae</i> + <i>M. bovirhinis</i> | 4 | 2,25 | 177 |
| <i>M. conjunctivae</i> + <i>MmmLC</i> | 3 | 1,7 | 177 |
| <i>M. capricolum</i> + <i>M. alkalescens</i> | 1 | 0,5 | 177 |
| <i>MmmLC</i> + <i>M. alkalescens</i> | 1 | 0,5 | 177 |

Tabela 9. Resultados do crescimento de *Mycoplasma* spp. na 5^a lavagem e após macerado dos ácaros *R. auris* e *R. flechtmanni*, coletados de conduto auditivo de bovinos de abate, do sudeste do Estado do Rio de Janeiro.

| <i>Raillietia</i> spp. cultivados | Crescimento de <i>Mycoplasma</i> spp. (UFC/mL) | |
|-----------------------------------|--|--------------------------------------|
| | 5 ^a lavagem | Macerado após 5 ^a lavagem |
| 164 | 0 | 10 ³ a > 10 ⁷ |
| 54 | 10 ³ | 10 ³ < a 10 ⁷ |

4 DISCUSSÃO

A presença de micoplasmas no conduto auditivo externo de ruminantes domésticos tem sido reportada por diversos autores em diferentes países (COTTEW; YEATS, 1981, 1982; YATES et al., 1983; DaMASSA, 1990; DaMASSA et al., 1992; RIBEIRO et al., 1995ab; BARBOSA et al., 2000; MERCIER et al., 2007). Várias espécies de *Mycoplasma* neste sítio de localização são consideradas como constituintes desta microbiota (WHITCOMB; BOVÉ, 1983; WHITFORD et al., 1994; BARBER et al., 1986; WOLDEHIWET et al., 1990). A permanência de *Mycoplasma* no conduto auditivo de ruminantes está relacionada às condições abióticas adequadas deste local, que oferece a proteção osmótica, presença de esteróis, temperatura adequada e umidade. Este microhabitat pode atuar como fonte de micoplasmas para vias aéreas superiores e inferiores, além da glândula mamária e sistema reprodutivo. Portanto, *Mycoplasma* em caprinos e bovinos podem ser encontrados em animais assintomáticos e sintomáticos (WALZ et al., 1997; GIL et al., 1999; MAEDA et al., 2003; FRANCOZ et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; FOSTER et al., 2007; TARDY et al., 2007; DYER et al., 2008).

De acordo com a alta prevalência de 80% para micoplasmas encontrada neste trabalho no conduto auditivo de bovinos acredita-se que este sítio pode atuar como fonte de infecções micoplásmicas nos rebanhos do sudeste do Estado do Rio de Janeiro. Adicionalmente, ocorrendo em prevalências tão altas e concomitantemente com ácaros *Raillietia* spp. existe a grande probabilidade de transmissão entre rebanhos. Além disso, a constatação de que existe uma associação entre a presença de micoplasmas e ácaros no ouvido de bovinos somatiza esta problemática, uma vez que 74% dos animais estavam parasitados concomitante pelos dois agentes em questão. Estudos semelhantes foram reportados por diferentes autores (DaMASSA, 1983, 1990; DaMASSA; BROOKS, 1991; DaMASSA et al., 1992; RIBEIRO et al., 1995ab; WALZ et al., 1997; GIL et al., 1999; YERUHAM et al., 1999; MAEDA et al., 2003; LAMM et al., 2004; FRANCOZ et al., 2004; FOSTER et al., 2007; TARDY et al., 2007) os quais demonstraram a importância de ácaros por carream e disseminarem micoplasmas dos animais infectados a animais livres. Neste estudo a presença de várias espécies de *Mycoplasma* spp. ocorrendo em infecções mistas no conduto auditivo dos bovinos examinados, confirma que este sítio de localização é favorável crescimento e manutenção destes mollicutes, mesmo que ocorram sem determinar doença clínica.

Dentre as espécies de *Mycoplasma* isoladas no conduto auditivo de bovinos, neste estudo destacam-se os isolados do Grupo *Mycoplasma mycoides*, *MmmLC* e *M. capricolum*. Embora estas espécies já tivessem sido relatadas em surtos de micoplasmoses em caprinos no Brasil (NASCIMENTO; NASCIMENTO, 1986; CASTRO et al., 1989; D`ANGELIS et al., 1994; RIBEIRO et al., 1995ab), ainda não haviam sido relatadas em bovinos. A importância epidemiológica desses isolados de *MmmLC* e *M. capricolum* em conduto auditivo de bovinos assintomáticos ainda é incerta, uma vez que aspectos do potencial patogênico destas cepas nos bovinos ainda não foram avaliados no presente estudo, muito embora, em caprinos, estas duas espécies tem sido constantemente associadas a surtos de doenças respiratórias e poliartrite no país (NASCIMENTO et al., 1986; NASCIMENTO et al., 1990). Outro fato que merece destaque é que, em algumas regiões do Brasil, especialmente em áreas semi-áridas do nordeste, é comum bovino co-habitar com caprino, o que pode ser um fator de risco para ocorrência de micoplasmoses nestes animais, uma vez que além do contato direto, que favorece a transmissão, é comum a presença de ácaros (PADILHA; FACCINI, 1982;

SANTOS; FACCINI, 1996). Ressaltam-se que as cepas do GMM em conduto auditivo de bovinos podem, em alguma instância, atuar como fonte de infecções respiratórias para os bovinos, pois este local tem sido relatado como porta de entrada para infecções micoplásmicas (YATES et al., 1983; YERUHAM et al., 1999; WALZ et al., 1997; FRANCOZ et al., 2004; MAEDA et al., 2003; LAMM et al., 2004; FOSTER et al., 2007).

Das espécies isoladas neste estudo merece destaque a espécie *M. bovis*, que embora em baixa prevalência, em outros países esta espécie tem sido frequentemente associada a surtos de otite média e interna em rebanhos leiteiros e a surtos de doenças respiratórias em bezerros lactentes (YERUHAM et al., 1999; MAEDA et al., 2003; LAMM et al., 2004; DYER et al., 2008). No Brasil, casos de otite clínica em bovinos causada por *M. bovis* ainda não foram reportados, mas esta espécie em nosso país, tem sido encontrada frequentemente associada a surtos de mastite e agalaxia em bovinos leiteiros, bem como a doenças respiratórias em bezerros lactentes (ROSSINI, 1978; LIBERAL et al., 1982; METTIFOGO et al., 1996; PRETTO et al., 2001; GEVAERT, 2006; MARQUES et al., 2007). No presente estudo não foi possível estabelecer relação entre a presença de *M. bovis* no conduto auditivo dos bovinos com a ocorrência de doenças nos animais, uma vez que a pesquisa foi realizada em animais nas linhas de abate, mas a presença de *M. bovis* deve ser um alerta para possíveis surtos de mastites em rebanhos leiteiros e de pneumonias em bezerros na fase de lactação no Brasil. Deve-se ressaltar que esta espécie, em bovinos, nos países da América do Norte, é atualmente considerada a mais importante causa de doença respiratória em locais onde *MmmSC* foi erradicada. Em Países, com alta prevalência de doença respiratória por *M. bovis*, a alta patogenicidade destas infecções eleva esta espécie a primeiro lugar em importância sanitária nas regiões livres de *MmmSC* (WALZ et al., 1997; RODRIGUEZ et al., 1996; NICHOLAS; AYLING, 2003; MAEDA et al., 2003; TENK, 2005). Sabe-se que estas duas espécies mantêm estreitas interações genéticas, que não tem sido observadas nem mesmo entre *MmmSC* com outros membros do GMM, o que tem sido alvo de numerosas pesquisas (WESTBERG et al., 2003).

M. bovirhinis ocorreu com uma prevalência em torno de 10% e, no Brasil, esta espécie tem sido associada a distúrbios reprodutivos em touros e a vulvovaginite em vacas, além de casos de abortos (NASCIMENTO et al., 1998, 2005; CARDOSO; VASCONCELOS, 2004). Em associação com *M. bovigentialium* colonizam o sistema reprodutivo e são responsáveis por diminuição na performance reprodutiva dos rebanhos. As outras espécies isoladas no conduto auditivo de bovinos (*M. alkalescens*, *M. arginini* e *M. conjunctivae*), podem ser encontradas normalmente em animais assintomáticos para micoplasmose e em alguns casos podem determinar doença clínica. *M. arginini* faz parte da microbiota da orofaringe de bovinos e caprinos (BARBER et al., 1986; WOLDEHIWET et al., 1990) e, eventualmente, é encontrado em infecções micoplásmicas como agente secundário. *M. conjunctivae* faz parte da microbiota da mucosa ocular de ruminantes, mas, em circunstâncias favoráveis, pode determinar uma severa ceratoconjuntivite infecciosa, doença conhecida mundialmente como IKC ou “pink eye”, responsável por sérias perdas econômicas em rebanhos de caprinos e ovinos em todo o mundo (LANGFORD; DORWARD 1969; GIACOMETTI et al., 1998, 1999, 2002; LEVISOHN et al., 2004; SNOWDER et al., 2005; ALBERTI et al., 2006; LYSNYANSKY et al., 2007). No Brasil, *M. conjunctivae* tem sido relatado apenas em caprinos e ovinos com e sem ceratoconjuntivite infecciosa (GREGORY et al., 2003, 2004; NETO et al., 2004) porem em bovinos, surtos de ceratoconjuntivite por *M. conjunctivae* ainda não foram notificados, mas em países da Europa este agente ocorre com frequência e faz parte da etiopatogenia da IBK dos bovinos, onde comumente ocorrem infecções de etiologias

múltiplas envolvendo vários microorganismos como *Moraxella bovis*, *M. bovis*, *M. conjunctivae* e *M. bovoculi*.

No conduto auditivo, além de micoplasmas também se constatou alta prevalência de ácaros do gênero *Raillietia* spp., que são comuns em rebanhos bovinos de várias regiões do Brasil, sendo responsáveis por quadros de otite clínica e subclínica, inclusive com morte de animais nos casos mais graves (LEITE et al., 1989; NUNES et al., 1975; COSTA et al., 1992; FACCINI et al., 1992ab; JUBB et al., 1993; REBOUÇAS et al., 1993; FILHO et al., 1996; KRAMETTER-FROETSCHER et al., 2004). Assim, a prevalência encontrada para o gênero *Raillietia* spp. está de acordo com os estudos anteriores realizados no Brasil (FONSECA, 1983; FONSECA; FACCINI, 1983; FACCINI et al., 1992ab; FILHO et al., 1996). Entretanto, ao contrário do que vem sendo notificado no País, destacou-se neste estudo a presença de ambas as espécies *R. auris* e *R. flechtmanni*. Estas ocorreram em altas frequências e em infestações mistas. Estes achados estão de acordo com as hipóteses levantadas por Faccini et al. (1992ab) quanto à ocorrência destas duas espécies nos bovinos do Brasil, uma vez que após constatarem a existência de *R. flechtmanni*, parasitando conduto auditivo de bovinos no País, ressaltaram a importância de estudos adicionais para medir a real prevalência destas espécies. Os estudos anteriores somente se referiam a espécie *R. auris*, e possivelmente houve uma subnotificação de *R. flechtmanni*, no Brasil.

Após o processamento de ácaros do gênero *Raillietia* spp. para isolamento de micoplasmas verificou-se que estes espécimes albergam várias espécies de micoplasmas e que estas são as mesmas isoladas do conduto auditivo dos bovinos. Estes achados foram constatados após contagem de microorganismos na 5ª lavagem e após maceração dos ácaros. Foi possível constatar uma associação significativa na presença de micoplasmas nos ácaros macerados. A alta frequência de micoplasmas presentes no interior dos ácaros podem indicar, a semelhança do que ocorre em outros mollicutes, uma relação simbióticas entre micoplasmas e ácaros (WHITCOMB; DAVIS, 1970; NIENHAUS; SIKORA, 1979; GARNIER et al., 2001). Ressalta-se que houve uma associação significativa maior entre as fêmeas dos ácaros *R. flechtmanni* e *Mycoplasma* do que com as fêmeas de *R. auris* e *Mycoplasma*, apesar de *R. flechtmanni* ocorrer com uma menor prevalência. Nos espécimes machos de *R. auris* e *R. flechtmanni* também foi possível constatar a presença de micoplasmas, mas estes provavelmente não tenham tanta importância epidemiológica quanto as fêmeas, pois estas é que são responsáveis pela transmissão transovariana e transestadial na natureza, na hipótese destes micoplasmas serem transmitidos biologicamente. Neste estudo não houve diferença estatística significativa entre os machos de *R. auris* e *R. flechtmanni*, isto corrobora que *R. auris* e *R. flechtmanni* ocorrem realmente com prevalências muito próximas.

A presença de *Mycoplasma* spp. e ácaros no conduto auditivo de bovinos é de suma importância, uma vez que estes ácaros tem sido reportados como veiculadores de micoplasmas de rebanhos portadores a livres. As espécies de *Mycoplasma* spp. identificadas neste estudo, presentes em conduto auditivo e em ácaros são as mesmas isoladas em bovinos e caprinos em diferentes ocasiões (DaMASSA, 1983, 1990; DaMASSA; BROOKS, 1991; DaMASSA et al., 1992; COTTEW; YEATS, 1981, 1982; RIBEIRO et al., 1995ab; WALZ et al., 1997; GIL et al., 1999; MAEDA et al., 2003; FRANCOZ et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; MERCIER et al., 2007; FOSTER et al., 2007; DYER et al., 2008). Além de ácaros gamasídeos, os psoroptídeos também estão envolvidos na transmissão de micoplasmas para bovinos e caprinos (COTTEW; YEATS, 1981, 1982; DaMASSA, 1983, 1990; DaMASSA; BROOKS, 1991; RIBEIRO et al., 1995ab). No Brasil, ácaros psoroptídeos, ocorrem em altas frequências no semi-árido nordestino e possivelmente estão associados à transmissão de micoplasmas entre caprinos nestas regiões, uma vez que *R. caprae* não tem sido reportada

nestas áreas. Nas regiões sul e sudeste *R. caprae* pode ter maior importância epidemiológica nesta cadeia de transmissão, pois ocorre em altas prevalências, embora também possam ocorrer infestações mistas tanto por *R. caprae* quanto por *P. cuniculi* (RIBEIRO et al., 1995ab; FACCINI; RIBEIRO, 2008).

A presença de ácaros e micoplasmas no conduto auditivo externo de bovinos indica que este sítio de localização alberga várias cepas de micoplasmas de alta patogenicidade, apesar dos animais apresentarem-se assintomáticos para micoplasmoses. Com base na alta prevalência de micoplasmas no interior dos ácaros podemos inferir que os mesmos podem transmitir estes mollicutes entre bovinos, mesmo que de forma mecânica. A etiopatogenia das micoplasmoses transmitidas por ácaros ainda não está bem esclarecida no Brasil, necessitando de mais averiguações. Destaca-se que este é o primeiro estudo demonstrando a presença de micoplasmas em conduto auditivo de bovinos e nas espécies de *R. auris* e *R. flechtmanni* parasitas de bovinos no Brasil, colaborando para os estudos epidemiológicos futuros.

5 CONCLUSÕES

- No Brasil, bovinos assintomáticos para micoplasmoses albergam em seu conduto auditivo várias espécies de *Mycoplasma* spp. e duas espécies de ácaros do gênero *Raillietia*;
- Foi detectado um estreito parasitismo, com associação significativa entre a presença de *Mycoplasma* spp. e ácaros *Raillietia* spp. no conduto auditivo dos bovinos examinados;
- As espécies do gênero *Mycoplasma* spp. encontradas no conduto auditivo dos bovinos examinados foram as mesmas encontradas nos ácaros *Raillietia* spp.
- As espécies do gênero *Raillietia* estudadas foram identificadas como *R. auris* e *R. flechtmanni*, as quais ocorreram em prevalências aproximadas nos bovinos examinados, e as duas espécies de ácaros estão estreitamente relacionadas com *Mycoplasma* spp.

CAPITULO II

DETECÇÃO DO GRUPO *Mycoplasma mycoides* (GMM) POR IMUNOPEROXIDASE INDIRETA (IPI) E PCR-REA EM CONDUTO AUDITIVO DE BOVINOS DE ABATE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

Deteção do Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) por imunoperoxidase indireta (IPI) e PCR-REA em conduto auditivo de bovinos de abate no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

O Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) foi diagnosticado por PCR-REA e imunoperoxidase indireta (IPI) em 60 amostras de lavados de conduto auditivo de bovinos no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. As lavagens foram feitas com uso de seringas estéreis contendo um volume de 60 mL de solução salina tamponada (PBS pH 7,2). As amostras obtidas foram diluídas em glicerol (1:2) e estocadas a -20°C até uso. Estas amostras foram diluídas até 10⁻⁵ e repicadas em meio Hayflick modificado, sólido e líquido, sendo incubados a 37°C por 48-72 horas. As placas foram mantidas sob condições de microaerofilia e observadas diariamente, para visualização das colônias típicas em “ovo-frito”. Neste estudo, foram selecionados 35 cultivos de *Mycoplasma* spp. de acordo com propriedades bioquímicas e fisiológicas indicativas do GMM. A prevalência obtida para o GMM na IPI foi de 20,0% (12/60) enquanto na PCR-REA foi de 41,7% (25/60). Das cepas tipificadas pela IPI 58,3% (7/12) foram *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC e 41,7% (5/12) foram *M. capricolum*. Na PCR-REA o grupo *M. mycoides* foi confirmado pela visualização de um amplicon de 785bp, compatível com este grupo. O valor encontrado no teste de Kappa para associação entre estes testes foi de 0,14 (p>0,05), considerado fraco. Na clivagem do produto da PCR com a enzima de restrição *AluI*, os fragmentos obtidos foram de 81, 98, 186 e 236pb, mas não de 370pb o qual é compatível com *M. mycoides mycoides* SC de origem bovina.

Palavras-chave: Grupo *Mycoplasma mycoides*, conduto auditivo de bovinos, diagnóstico por PCR-REA.

ABSTRACT

Detection of *Mycoplasma mycoides* cluster (MMC) by indirect immunoperoxidase (IPI) and PCR-REA in the ear canal of slaughterhouse cattle from Rio de Janeiro State, Brazil

Mycoplasma mycoides Cluster (MMC) was diagnosed by PCR-REA and indirect immunoperoxidase (IPI), both, carried out in 60 flushing from external ear canal, collected at slaughter time from bovine of the State of Rio de Janeiro, southeastern, Brazil. Sterile syringes (60mL) loaded with buffer solution (PBS, pH 7.2) were used for the ear canal flushing. The obtained samples were diluted in glycerol (1:2) and stored at -20°C until use. These specimens were diluted up to 10⁻⁵, inoculated in liquid and solid modified Hayflick's media and incubated at 37°C for 2-3 days, being the plates put into jar for the obtention of microaerophilia condition. The agar plates were observed every two days under stereomicroscope for the presence of typical colonies "fried-egg". In this study, 35 strains selected in agreement with their biochemistry and physiologic proprieties, were used. Under IPI the prevalence obtained for MMC was 20.0% (12/60) while by PCR-REA it was 41.7% (25/60). The IPI typing of these isolates resulted in 58.3% (7/12) for *M.mycoides mycoides* LC and 41.7% (5/12) for *M. capricolum*. PCR-REA for *M. mycoides* Cluster was confirmed by the amplicon size of 785bp, compatible with this group. The Kappa value for the association between these two tests was 0.14 (p>0,05), considered weak. After restriction analysis with *AluI* in all Mycoides cluster strains the fragments size obtained were of 81, 98, 186 and 236bp, but not of 370bp that is compatible with *Mycoides mycoides mycoides* SC of bovine origen.

Key words: *Mycoplasma mycoides* Cluster, ear canal of bovine, PCR-REA diagnostic.

6 REVISÃO DE LITERATURA

Micoplasmas diferenciam-se fenotipicamente de outras bactérias pelo pequeno tamanho (0,3-0,8µm), com genoma de (0,58-2,2 Mb) e ausência de parede celular. Taxonomicamente esta última característica é usada para separação destes microorganismos na Classe Mollicutes (*mollis*, mole, *cutis*, pele, em latim) (RAZIN et al., 1998), entretanto atualmente a análise de sequenciamento tem sido a base para estudos de filogenia e evolução (PETTERSSON et al., 1994, 1996ab). A partir destes estudos com base em análise de rRNA, ficou demonstrado que esta classe se originou há mais de 605 milhões de anos, de um único ramo no grupo filogenético das Bactérias (bacilos, clostrídios, enterococos, lactobacilos, estreptococos e estafilococos), a partir de um ancestral comum “firmicutes”, que continha baixo conteúdo de G+C. Esta classe, posteriormente com processos evolutivos se dividiu e originou dois ramos principais contendo num deles: Acholeplasma, Anaeroplasma, Asteroplasma e o Filo Phytoplasma e outro ramo com: Spiroplasma, Mesoplasma, Ureaplasma e Mycoplasma (JOHANSSON; PETTERSSON, 2002; MANILOFF, 2002, citado por SIRAND-PUGNET et al., 2007). Hoje, sabe-se que micoplasmas diferenciam-se dos outros procariotos em apenas um ou dois rRNA operons (PETTERSSON et al., 1994, 1996ab; THIAUCOURT; ROGER, 2005). De acordo com Sirand-Pugnet et al. (2007) de 17 genomas de mollicutes seqüenciados, 15, estão distribuídos em três grandes grupos, Pneumoniae, Hominis e Spiroplasma, destes mollicutes, 13 são do gênero *Mycoplasma*. No Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM), segundo Sirand-Pugnet et al. (2007), cepas como *M. capricolum* subsp. *capricolum* possuem 23,77% de G+C no genoma, e mudanças na razão de GC, tem sido associados a replicação cromossomal nesta espécie. Em investigações sobre repetições de códons UGG em *M. mycoides* subsp. *mycoides*, verificou-se que estas podem influenciar o comportamento bioquímico desta cepa (WESTBERG et al., 2003). Estes autores ressaltam a importância de recentes achados em cepas do GMM, como a presença de um tRNAAGU, em *Mcc* e *MmmSC*. Este tipo de tRNA está associado a eventos de transferência horizontal de genes (HGT) e tem sido encontrado também em *M. agalactiae* (BROWN et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2005; SIRAND-PUGNET et al., 2007). Este evento de HGT está associado à adaptação destas espécies de micoplasmas a hospedeiros ruminantes e provavelmente foram transferidos do GMM a um ancestral de *M. agalactiae*.

Mycoplasma mycoides compreende espécies que são encontradas em caprinos, ovinos e bovinos. Os micoplasmas deste grupo são conhecidos pela sua alta patogenicidade e por causarem sérios prejuízos econômicos a produção de ruminantes. O GMM é constituído de seis espécies estreitamente relacionadas em suas características bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e sorológicas (WHITFORD et al., 1994; RAZIN; TULLY, 1995, 1996), além de filogenéticas (PETTERSSON et al., 1996ab; RAZIN et al., 1998). Estas semelhanças genômicas e fenotípicas causam problemas taxonômicos que dificultam o diagnóstico laboratorial, principalmente com uso de técnicas convencionais (LE GRAND et al., 2004; PERSSON et al., 1999). As espécies e subespécies de micoplasmas que constituem o GMM são as seguintes: *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo SC (*MmmSC*), *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC (*MmmLC*), *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*) e *M. bovine* Sorogrupo 7 (*Msp7-PG50*).

A classificação e tipificação dos membros do GMM são reconhecidamente complexas, e existem algumas divergências entre pesquisadores desta área. Entretanto, com advento da biologia molecular a tipificação e distinção das subespécies deste grupo tem alcançado

grandes avanços, principalmente a partir de sequenciamento genético de vários membros da Classe Mollicutes e do GMM (DYBVIG; VOELKER, 1996; PETTERSSON et al., 1996ab; RAZIN et al., 1998; THIAUCOURT; ROGER, 2005; SIRAND-PUGNET et al., 2007). Assim, a partir da análise dos genes 16SrRNA, 5SrRNA e de seqüências de tRNA, as bases filogenéticas de *Mycoplasmatales* foram elucidadas. Estudos descritivos devem ser embasados pela análise deste gene (DYBVIG; VOELKER, 1996; COMITÊ INTERNACIONAL de MOLLICUTES-TMC, 1996; RAZIN et al., 1998; SIRAND-PUGNET et al., 2007). Weisburg et al. (1989) e Tully et al. (1993) propuseram uma reclassificação do GMM uma vez que, com base nos membros dos subgrupos *Mycooides* e *Capricolum*, estes estão mais relacionados geneticamente com *Spiroplasma* do que com outras espécies de *Mycoplasma*, e algumas espécies do grupo *Mycooides* estão em avaliação pelo TCM.

Pyle et al. em 1990, realizaram estudos do genoma do GMM com uso de enzimas de restrição e compararam cepas de *MmmSC* (PG1, KH2J, Gladysdale e V5), *Mycoplasma* PG50 e *MmmLC*. Eles verificaram que *MmmSC* exibe, após restrição, regiões totalmente conservadas no genoma, nas posições *loci* mapeadas. Nas cepas *MmmLC* e PG50, estas regiões conservadas do genoma foram menos observadas. Em 1994, Pettersson et al., após sequenciamento do gene 16SrRNA de micoplasmas por “solid-phase sequencing” demonstraram que este pode ser usado para estabelecer relações filogenéticas, classificação e identificação destes mollicutes. Assim, a partir de estudos neste gene verificaram que *M. bovirhinis* e *M. canis* possuem semelhança de 97,9%, e que *M. canadense* tem 98,9% de similaridade com *M. arginini*. Estes autores também constataram uma microheterogeneidade entre o conteúdo de TA e CG, nas espécies de micoplasmas do GMM, isto devido a diferenças na seqüência de dois rRNA operons.

Em estudos posteriores, Pettersson et al. (1996ab), realizaram filogenia do GMM, com base no gene 16SrRNA, verificando neste grupo regiões altamente conservadas e eventuais polimorfismos evolutivamente distribuídos em regiões semiconservadas. Neste estudo, *MmmSC* apresentou um polimorfismo em AG, na posição 69, enquanto que nas espécies *MmmLC* e *Mmc*, nesta mesma posição, ocorre A, em ambos os operons *rmA* e *rmB*. Também em *MmmSC* verificaram duas adenosinas extras na posição 1269 e 1270 do *rmA* operon. Assim, em repetidas análises de sequenciamento, estes autores comprovaram que no GMM apenas *MmmSC* difere no tamanho da seqüência nos *rmA* e *rmB* operons. Portanto, a partir do conhecimento do 16SrRNA sugeriram mudanças em alguns subgrupos do GMM. A partir destas observações, foi sugerido que *Mycoplasma* sp. PG50 fosse reclassificado como *M. capricolum*, e que *M. mycooides* subsp. *mycooides* SC fosse renomeado apenas de *M. mycooides* e as outras duas espécies do grupo de *M. capri* subsp. *mycooides* e *M. capri* subsp. *capri*. Outra sugestão foi de nomear *M. mycooides* subsp. *mycooides* LC como outra subespécie. Em estudos subseqüentes, Pettersson et al. (1996b), verificaram que as espécies *M. alkalescens*, *M. bovirhinis*, *M. bovis* e *M. agalactiae* possuem microheterogenicidade, e que outras espécies de bovinos após sequenciamento se agruparam no grupo Hominis, estas foram: *M. bovoculi*, *M. canadense* e *M. alkalescens*. Isto não ocorreu para *M. conjunctivae* possui características genéticas mais próximas do grupo *M. neurolyticum*. As cepas de *M. agalactiae* e *M. bovis* apresentaram 99,8% de semelhança, embora sejam comprovadamente distintas.

Em análises de variações genômicas em 16SrRNA, Pettersson et al. (1998) e Kokotovic et al. (2000) verificaram polimorfismos por RFLP em *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* de diferentes países da África e do Oriente Médio, confirmando a homogeneidade genética de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*. Esta homogeneidade também foi observada pela análise de proteínas celulares e por hibridização de DNA-DNA. Vilei et al. (2000) e Vilei e Frey (2001) sugeriram a separação de cepas de *MmmSC* da

Europa em um grupo a parte, das cepas da África e Austrália, pelas diferenças antigênicas. Esta separação se baseou em análises genéticas, que demonstraram presença de segmentos genômicos IS1296 em cepas da África, que não foram verificados em cepas do grupo Europeu. Este segmento tem relação com elemento IS1634 e a lipoproteína *LppB*. Estas diferenças genéticas foram causadas pela eliminação destes segmentos em cepas européias. Segundo Nicholas et al. (1996), os surtos de CBPP provocados por cepas européias são menos virulentos, embora a doença seja mais insidiosa, os bovinos apresentaram poucos sinais clínicos distintivos e raramente morrem. Vilei e Frey (2001) também relataram que as cepas *MmmSC* isoladas da Europa em 1990, apresentavam perda cromossomal de 8,84kb, nos genes do operon ABC de transporte de glicerol e da lipoproteína gene *LppB*. Estas cepas de *MmmSC* apresentavam grau de plasticidade maior do que o comum e a deleção cromossomal provavelmente interfere na infectividade das cepas européias, diminuindo sua virulência. Bischof et al. (2006) verificaram a presença de amplos segmentos duplicados em isolados de *MmmSC* de campo na Europa, África e em vacinas de *MmmSC* (PG1). Estes autores referem que, apesar das cepas de *MmmSC* apresentarem variações genéticas, estas só são evidenciadas após restrição dos elementos IS1296 e IS1634 em fingerprinting e pela análise de seqüência em multilocus.

Recentemente, Nicholas et al. (2008), sob recomendações do Comitê Internacional em Sistemática de Procariotos, propuseram a classificação de *Mycoplasma* sorogrupo 11 e *M. bovis genitalium* como uma única espécie, com base em características fisiológicas e comparações filogenéticas. Após análise seqüencial, amostras deste grupo mostraram 98-100% de similaridade, enquanto as outras demonstraram 86-95% para outras espécies de micoplasmas. Assim, amostras de *Mycoplasma* ovino/caprino do sorogrupo 11 deveriam a partir daí serem designadas como *M. bovis genitalium*. Estas mudanças também têm embasamento em propriedades bioquímicas e fisiológicas, bem como em resultados de SDS-PAGE, immunoblotting e ELISA. Micoplasmas deste grupo são conhecidos por causarem uma série de alterações em ruminantes como: vulvovaginite, cervicite, endometrite, epididimite e ooforite. Na sorologia para *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovis* e *M. ovipneumoniae* foram observados 29 a 38% de reações cruzadas com os soros testados, e para *M. agalactiae*, 42% e 51% de reações cruzadas com os soros contra *M. bovis genitalium* e *Mycoplasma* sorogrupo 11, respectivamente. Portanto, mesmo utilizando as provas diagnósticas anteriormente citadas, é impossível distinguir entre cepas de *Mycoplasma* sorogrupo 11 e *M. bovis genitalium*, observação que deverá ser considerada na próxima atualização do manual Bergey's.

Diante das dificuldades de classificação e taxonomia do GMM, os métodos de tipificação utilizados no diagnóstico laboratorial exibem falhas. Estas, comprometem o conhecimento da verdadeira situação epidemiológica das micoplasmoses dos ruminantes, especialmente das cepas que estão estreitamente relacionadas. A problemática no diagnóstico de cepas do GMM contribuiu para o desenvolvimento de várias técnicas diagnósticas, visando melhorar a performance dos métodos utilizados na rotina laboratorial, principalmente em surtos de micoplasmoses e nos programas de monitoramento dos rebanhos. Assim, inúmeras técnicas de imunodiagnóstico e moleculares, foram pesquisadas para tipificar as espécies e subespécies deste grupo (PETTERSSON et al., 1994; MISEREZ et al., 1997; FREY et al., 1998; MONNERAT et al., 1999ab; PERSSON et al., 1999; KOKOTOVIC et al., 2000; VILEI, 2000; LOREZON et al., 2000; VILEI et al., 2001; VILEI; FREY, 2004; LE GRAND et al., 2004; DEDIEU et al., 2005; BASHIRUDIN et al., 2005; GORTON et al., 2005; BISCHOF et al., 2006; VILEI et al., 2006). As técnicas baseadas em ácidos nucléicos para diagnóstico de membros do Grupo *Mycoides mycoides* mais utilizadas são: PCR, Nested-PCR, PCR-REA/RFLP, PCR-LIF, PFGE, AFLP, Real-Time-PCR, RAPD, Multiplex-PCR,

SDS-PAGE. Além das técnicas moleculares a descoberta de diferentes proteínas na superfície da membrana celular de micoplasmas tem permitido usá-las como ferramentas de imunoprofilaxia e em diagnóstico (MISEREZ et al., 1997; FREY et al., 1998; MONNERAT et al., 1999ab; BROWNING et al., 2005).

De acordo com Markham e Noormohammadi (2005), Blanchard e Browning (2005), vacinas desenvolvidas a partir de proteínas de superfície da membrana de micoplasmas, vem sendo utilizadas em países da África para vacinação contra CBPP, as quais já foram testadas em diferentes ocasiões. Devido à experiências mal sucedidas com a vacina V5, estas campanhas foram suspensas. Atualmente as vacinas utilizadas no controle da CBPP, tem eficiência imunogênica comprometida com segurança. Além das proteínas de superfície, pesquisas recentes apontam para o uso de polissacarídeos capsular (CPS) e moléculas de citoaderência como promissoras no desenvolvimento de vacinas para *MmmSC* (BLANCHARD; BROWNING, 2005). Markham e Noormohammadi (2005) referem que a técnica de hibridização de DNA pode ser utilizada para separar membros do GMM, mas esta apenas estima as relações entre estes microorganismos, devido a possíveis falhas laboratoriais, o que não ocorre com a lipoproteína LppQ, específica de *Mycoplasma mycoides mycoides SC*, que é altamente antigênica e tem sido utilizada como proteína recombinante. Outra lipoproteína de membrana com alta antigenicidade é a P72 (72KDa) que é expressa em todos *MmmSC* (MISEREZ et al., 1997; FREY et al., 1998; MONNERAT et al., 1999ab; BLANCHARD; BROWNING, 2005).

No diagnóstico de cepas do GMM, anticorpos monoclonais têm sido utilizados com sucesso, principalmente como complementares em técnicas sorológicas (BASHIRUDIN et al., 2005), sendo frequentemente utilizados como bloqueio em ELISAs, no diagnóstico dos agentes da CBPP e CCPP, pois expressam consistentemente, epitopos específicos, em antígenos de superfície de micoplasmas. Isto ocorre porque os anticorpos monoclonais aumentam a sensibilidade e especificidade na detecção destas duas espécies em particular (BASHIRUDIN et al., 2005; MARKHAM; NOORMOHAMMADI, 2005). Entretanto, devido às altas heterogenicidade dentro de algumas cepas ou subespécies (*MmmLC* e *Mcc*) a utilização desta técnica é limitada.

Em se tratando de PCRs, Miserez et al. (1997) desenvolveram uma nested-PCR, sensível e específica para *MmmSC*, com base na seqüência de nucleotídeo da lipoproteína P72. Esta PCR não amplifica qualquer outra espécie do GMM e detecta até duas células viáveis por mL. Em amostras clínicas esta sensibilidade varia de 10^4 a 10^5 . A proteína P72, também está relacionada com *Mycoplasma* sp. sorogrupo 7 bovino (PG50). Lorenzon et al. (2000) desenvolveram uma PCR específica para distinguir cepas vacinais T1, T1/44 e T1sr de *MmmSC*, baseados em variações da seqüência do DNA, em regiões flanqueadas IS1296. Esta técnica foi eficiente e o amplicon visualizado nas cepas vacinais foi de 700pb, não sendo encontrado nas cepas de *MmmSC* testadas, esta PCR pode ser utilizada com sucesso em investigações nas áreas pós vacinais.

Segundo Monnerat et al. (1999a), PCR baseada na lipoproteína *LppA*, de *MmmLC* e *Mmc* pode ser utilizada para rápido diagnóstico destas duas espécies. Entretanto esta PCR não é capaz de distingui-las, devido à estreita relação entre elas. Isto também foi recentemente confirmado por Vilei et al. (2006), que sugeriram a união destas espécies em um único táxon, baseado em seqüência de genômica e análises protéicas. De acordo com estes autores PCRs com base no gene *rpoB*, presentes nas duas espécies, não as distingue. Frey et al. (1998) constataram que a lipoproteína de 67kDa de *Mycoplasma* sp. bovino sorogrupo 7, reage com anticorpos *MmmSC* do GMM, comprovando que o gene que codifica a proteína P67, está presente em todas as espécies do *Mycoplasma* sp. bovino sorogrupo 7. Os autores concluíram,

então, que PCRs baseada nesta proteína, podem também serem usadas para diagnóstico deste grupo.

Persson et al. (1999) demonstram que PCR-REA e PCR-LIF são ferramentas diagnósticas com alto padrão de sensibilidade e especificidade no diagnóstico da CBPP. Estas técnicas baseadas em segmentos específicos do gene 16SRNA são realizadas com primers específicos para micoplasmas do GMM. Estes segmentos detectados apresentaram polimorfismos nas cepas de *MmmSC* (PG1), onde foram observadas regiões poli A, contendo cinco adenosinas no *rmA* e sete no *rmB* operons, típicos do GMM. A sensibilidade da PCR-LIF varia de 0,3-0,4/UFC. Na PCR-REAP são obtidos amplicons de 785pb, e após restrição com *AluI* permite a separação de *MmmSC* de outras espécies do GMM. Isto ocorre devido *MmmSC* apresentar um polimorfismo na região 426 do *rmA* operon, tendo nesta posição uma Timina em vez de Guanina. Na ausência deste local de restrição para *AluI*, esta gera um fragmento a mais de 370bp, além dos de 236, 186, 98 e 81 comum a todas as espécies do GMM. Na PCR-REAP, o limite de detecção para cepas de PG1 varia de 3 a 4/UFC por reação de amplificação. Após restrição, o limite de detecção varia de foi de 30 a 40/UFC por reação, com sensibilidade estimada de 30 cópias de DNA por reação de amplificação. Estas duas formas de PCRs tem alta sensibilidade e especificidade, e recentemente foram avaliadas em amostra de campo (LE GRAND et al., 2004). Essas técnicas de PCR são utilizadas para diagnóstico de cepas do GMM, especialmente para separar cepas *MmmSC*, em áreas endêmicas, fornecendo diagnóstico rápido e em larga escala. Le Grand et al. (2004) constataram que PCR-REAP exibe alta especificidade para GMM. A PCR-REAP demonstrou um valor preditivo positivo de 98%, com sensibilidade intra-específica de 98%. Estes autores referem que de todos os tipos de PCR testados para identificação do GMM, nenhum é plenamente satisfatório, e nestas reações ocorrem divergências com os resultados sorológicos. Gorton et al. (2005) desenvolveram uma PCR real-time TaqMan para diagnóstico específico de *MmmSC* bovino. Esta técnica tem como vantagem não necessitar do isolamento do agente, rapidez pode ser usado em larga escala e não necessitar de restrição de produtos da PCR. Bashiruddin et al. (2005) testaram ELISA sandwich, PCR, PCR-LIF e *pleuroTRAP* para detectar cepas de *MmmSC* diretamente em pulmão, linfonodo e cultivos. Em nenhuma destas três técnicas a performance foi perfeita, sendo que a PCR-LIF e *pleuroTRAP* tiveram melhores resultados.

Tendo em vista as dificuldades diagnósticas do GMM e os fatores que limitam uma tipificação diagnóstica precisa, destaca-se o uso de técnicas moleculares como as melhores ferramentas diagnósticas disponíveis atualmente para tipificação destas espécies. Assim, dependendo das condições de infra-estrutura e recursos humanos, podem ser usadas com segurança. No Brasil são poucos os laboratórios equipados para diagnosticar membros do GMM. Neste estudo, objetivou-se detectar e tipificar cepas do GMM através das técnicas de imunoperoxidase indireta (IPI) e PCR-REA em isolados de micoplasmas, de conduto auditivo de bovinos do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Cultivos de *Mycoplasma* spp.

Foram utilizados 35 cultivos com confirmação do gênero *Mycoplasma* spp. que foram obtidos de 60 lavados de conduto auditivo de bovinos, conforme descrito no Capítulo 1. Estes isolados foram selecionados de acordo com características bioquímicas indicativas do Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) (RAZIN; TULLY, 1983; WHITFORD et al., 1994): fermentação de glicose, hidrólise arginina, formação de filmes e manchas e atividade de fosfatase. As colônias obtidas foram clonadas de acordo com Whitford et al. (1994) e tipificadas pela técnica de IPI segundo Imada et al. (1987). Cepas padrões de membros do GMM pertencentes à coleção Prof. Dr. Elmiro R. do Nascimento, UFF, Niterói-RJ, foram utilizadas como controles positivos nas reações de imunoperoxidase indireta e PCR-REA (Quadro 1). Para verificar concordância entre os resultados obtidos na IPI e PCR-REA foi utilizado o teste de Kappa (PEREIRA, 2003).

Quadro 1. Relação das amostras padrão do Grupo *Mycoplasma Mycoides* utilizados como controle positivos na padronização das reações de PCR.

| Espécie | Cepa | Hospedeiro | Origem |
|---|----------------|----------------|--------|
| <i>M. mycoides mycoides</i> LC | Y-goat | Caprino/ovino | Europa |
| <i>M. mycoides mycoides</i> SC | PG1 | Bovino | Europa |
| <i>M. mycoides mycoides</i> LC | GM12 | Caprino/ovino | USA |
| <i>M. capricolum</i> Subsp. <i>capricolum</i> | California Kid | Caprino/ovino | USA |
| <i>M. mycoides</i> Subsp. <i>capri</i> | PG3 | Caprinos/ovino | Europa |

7.2 Processamento de Micoplasmas para PCR-REAP, PCR-REA

Para extração de DNA utilizou-se 1mL de cada cultivo de *Mycoplasma* spp., que foi centrifugado a 13.500 rpm por 20 minutos a 4 °C. Um volume de 40µL do sedimento foi resuspenso em 460µL de tampão de lise (400µL de TE-dextrose [pH 8,4], 30µL proteinase K [240µg/mL], 30µL de SDS a 10%), com posterior incubação por 30 minutos a 55°C e banho de gelo por cinco minutos. O DNA foi extraído pelo método fenol:clorofórmio:álcool isoamílico em partes iguais (Sambrook et al. 1989), sendo então resuspenso em álcool etílico [PA] e mantido a -20°C “overnight”. Os pellets foram obtidos após centrifugação a 13.500 rpm por 20 minutos a 4°C, sendo então mantidos em 100µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Para reação de amplificação do DNA foram utilizados primers específicos para o GMM, os quais amplificam os segmentos *rmA* e *rmB* operons do gene 16SrRNA, com os primers F-REAP (5'-GAAACGAAAGATAATACCGCATGTAG-3') e R-REAP (5'-CCACTTGTGCGGGTCCCCGTC-3') (PERSSON et al., 1999; PETERSSON et al., 1996a). A reação da PCR constou de KCL 50mM, MgCL₂ 4mM, Tris-HCL 10mM pH 8,3; dNTPmix 0,8mM, 5pmol de cada primer, 0,5U de AmpliTaq, 15µL do DNA extraído e 57µL de água de PCR, totalizando um volume de 100µL. Para controle negativo nas reações foi utilizada água de PCR, em substituição ao DNA. A reação da PCR foi realizada em termociclador (Px2 Thermal Cycler) programado para 33 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. A reação foi pré-aquecida a 96 °C por 3 minutos com extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para diferenciar *M. mycoides* SC de outros membros do GMM o produto da PCR foi digerido com enzima de restrição *AluI* (Fermentas Life Science, São Paulo-SP) de acordo com protocolo do fabricante. A reação em volume final de 20µL constou de 1x tampão Tango (Tris-acetato 33mM pH 7,9, acetato de magnésio 10mM, acetato de potássio 66mM, BSA 0,1g/mL, DTT 1mM, glicerol 50%), 5U de enzima. A digestão foi realizada em termociclador (Px2 Thermal Cycler) a 37 °C por duas horas com inativação a 65 °C por 20 minutos. As amostras foram analisadas em gel de agarose a 3,2% corado em brometo de etídio (5%) e os fragmentos obtidos foram visualizados sob luz ultravioleta. Foi utilizado o marcador de peso molecular 100pb (Ladder[®], Rio Grande do Sul).

7.3 PCR para MMMLC

Na padronização da PCR específica para MMMLC foram utilizados cultivos das cepas padrão descritas no Quadro 1. Estas foram submetidas às mesmas técnicas de extração de DNA, descritas no item 2.2. Em seguida o DNA extraído foi utilizado em reações da PCR com os primers específicos para *MmmLC* e *Mmc*, de acordo com protocolo de Monnerat et al. (1999a), com as seguintes seqüências: MMMLC2-L 5'-CAATCCAGATCATAAAAAACCT-3' e MMMLC1-R 5'-CTCCTCATATTCCCCTAGAA-3', os quais geram um amplicon de 1049bp. A reação da PCR foi realizada em termociclador (Px2 Thermal Cycler) programado para 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 49 °C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A reação foi pré-aquecida a 96 °C por 3 minutos com extensão final a 72 °C por 5 minutos posterior resfriamento a 4 °C por 10 minutos.

7.4 PCR para MMMSC

Na padronização da PCR específica para MMMSC foram utilizados cultivos das cepas padrão também descritas no Quadro 1. Estas foram submetidas as mesmas técnicas de extração de DNA, descritas no item 2.2. Em seguida o DNA extraído foi utilizado em reações da PCR com os primers específicos para *MmmSC*, de acordo com protocolo de Miserez et al. (1997), com as seguintes seqüências: primer externo SC3NEST1-L 5'-ACAAAAAGAAGATATGGTGGTGG-3' e SC3NEST1-R 5'-ATCAGGTTTATCCATTGGTGG-3', os quais geram um amplicon de 717pb na primeira reação da NESTED-PCR, e na segunda reação um amplicon de 503pb, com os primers internos: SC3VII 5'-ATTAGGATTAGCTGGTGGAGGAAC-3' e SC3IV-S 5'-TCTGGGTTATTTCGAACCATTAT-3'. A reação da PCR foi realizada em termociclador (Px2 Thermal Cycler) programado para 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. A reação foi pré-aquecida a 94 °C por 3 minutos com extensão final a 72 °C por 5 minutos posterior resfriamento a 4 °C por 10 minutos.

8 RESULTADOS

8.1 Micoplasmas do GMM tipificados por IPI e PCR-REAP

Dos 60 condutos auditivos de bovinos pesquisados, micoplasmas foram isolados em 48, onde 83% (40/48) fermentaram glicose e 14,6% (7/48) hidrolisaram arginina. Em 35 cultivos verificaram-se características bioquímicas indicativas do GMM. Na tipificação pela imunoperoxidase indireta (IPI) obteve-se uma prevalência para o GMM de 20,0% (12/60), enquanto que pela PCR-REA a prevalência foi de 41,7% (25/60). Dos 12 isolados tipificados pela IPI 58,3% (7/12) tiveram reação positiva intensa para a espécie *MmmLC* (Figura 1) e 41,7% (5/12) para *M. capricolum*. A concordância entre IPI e PCR pelo teste de Kappa, foi tida como fraca, indicando que não há associação entre as técnicas ($K=0,14$, $p>0,05$) (Tabela 1).

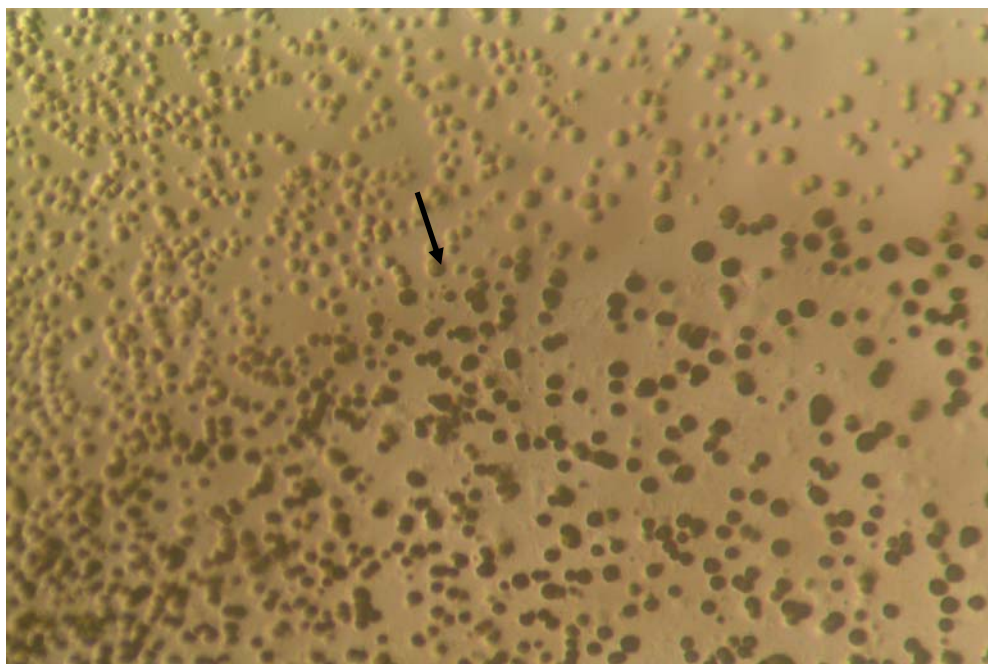


Figura 1. Resultado obtido pela IPI em cultivos de lavados de conduto auditivo de bovinos, colônias de micoplasma reativas para *M. mycoides mycoides* LC (*MmmLC*).

Tabela 1. Resultados obtidos entre os isolados de *Mycoplasma* spp. do Grupo *Mycoplasma mycoides* (GMM) detectados através de IPI e PCR, em de conduto auditivo de bovinos, no sudeste do Estado do Rio de Janeiro.

| Diagnóstico para Grupo GMM por (IPI) | PCR-REAP | | Total |
|--|-----------|-----------|-----------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 10 | 2 | 12 |
| Negativo | 15 | 8 | 23 |
| Total | 25 | 10 | 35 |

Kappa=0,14 (p>0,05)

Na PCR-REAP para os cultivos de lavados de ouvido de bovinos, foi possível visualizar um amplicon específico de 785pb, compatível com o GMM. Na Figura 2A, estão demonstradas as cepas do GMM que foram tipificadas pela IPI e confirmadas como membros do GMM após a PCR-REAP. Este amplicon também foi verificado nas cepas de referência utilizadas como controle positivo. Os resultados obtidos para todos cultivos de lavados de conduto auditivo de bovinos na PCR-REAP estão demonstrados na Figura 3A, nestes também foi observado o amplicon de 785pb característico do GMM.

Na PCR-REA, após clivagem dos amplicons de 785pb das cepas de referências foram visualizadas em gel de agarose, fragmentos com os seguintes tamanhos: 81, 98, 186 e 236pb. Estes fragmentos foram identificados também nos isolados tipificados pela IPI (Figura 2B), bem como nos demais isolados do GMM obtidos de lavados de conduto auditivo de bovinos através da PCR-REAP (Figura 3B). Somente na cepa de referência *MmmSC* (PG1), utilizada como controle positivo foi visualizado um fragmento de 370pb, específico para o agente da CBPP. Embora, considerada rarefeita, foi possível sua visualização sob luz ultravioleta, no entanto na fotomicrografia este fragmento não foi visível. Nos isolados de ouvido de bovinos não foi detectado nenhum fragmento com tamanho de 370pb, compatível com *MmmSC*.

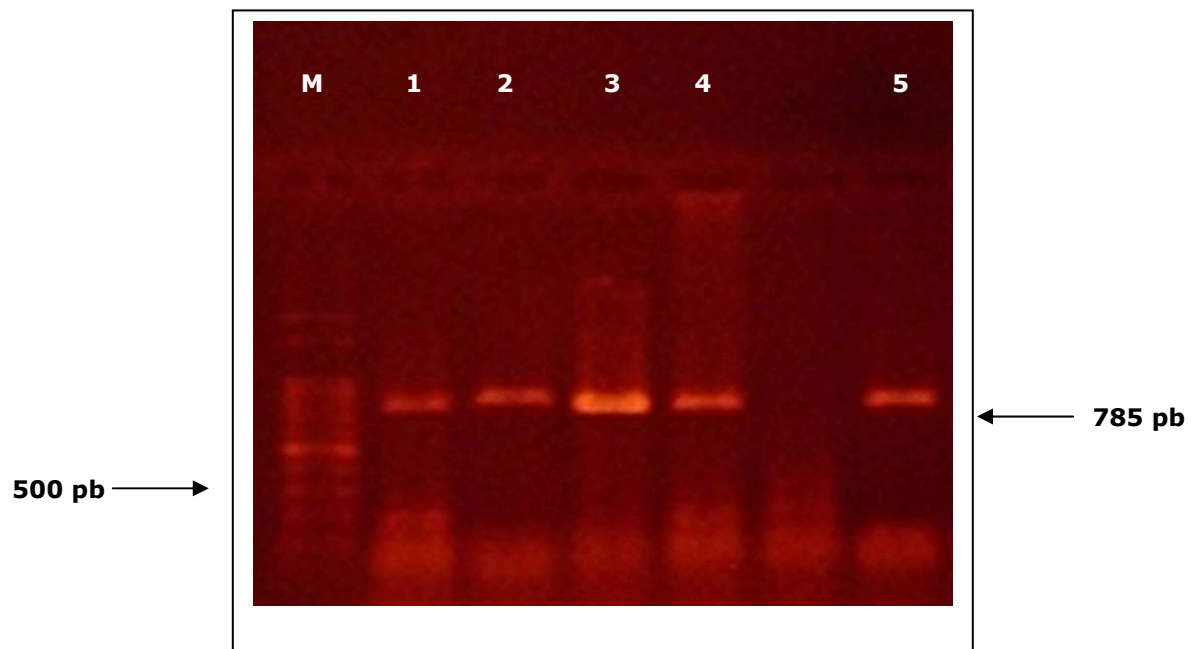


Figura 2A. Resultados da PCR-REAP para GMM, em cultivos de lavados de conduto auditivo de bovinos, no sudeste do Estado do Rio de Janeiro. M: marcador de peso molecular (Ladder 100pb), Lane 1-5: micoplasmas isolados de lavados de ouvido tipificados pela IPI (Lanes 1,2,4 e 5: *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC; Lane 3: *M. capricolum* subsp. *Capricolum*).

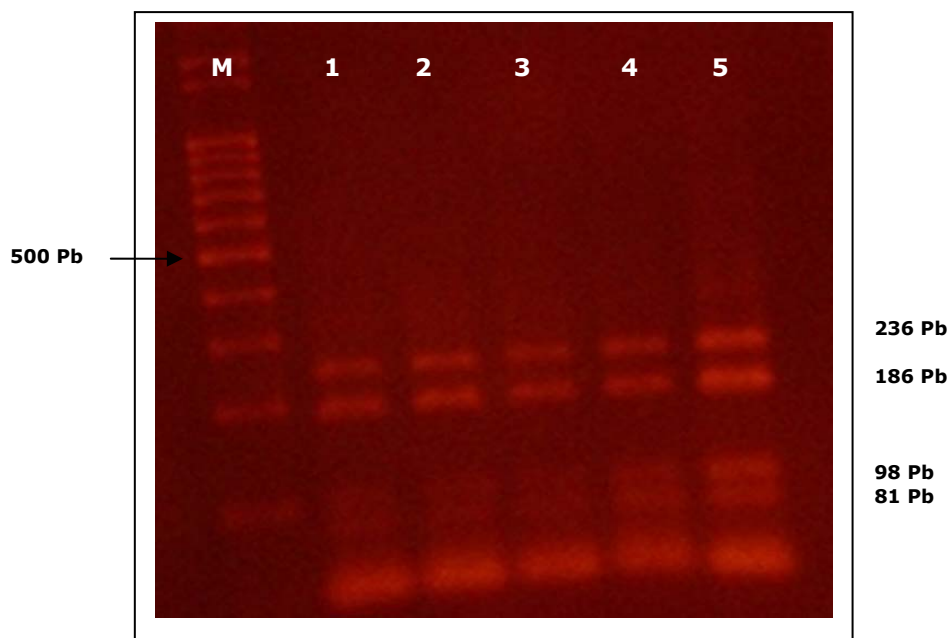


Figura 2B. Resultados dos fragmentos obtidos para o GMM, restrição de endonuclease com *AluI*. M: Ladder100pb, Lane: 1-5 em cultivos de lavados de conduto auditivo de bovinos, tipificados pela IPI.

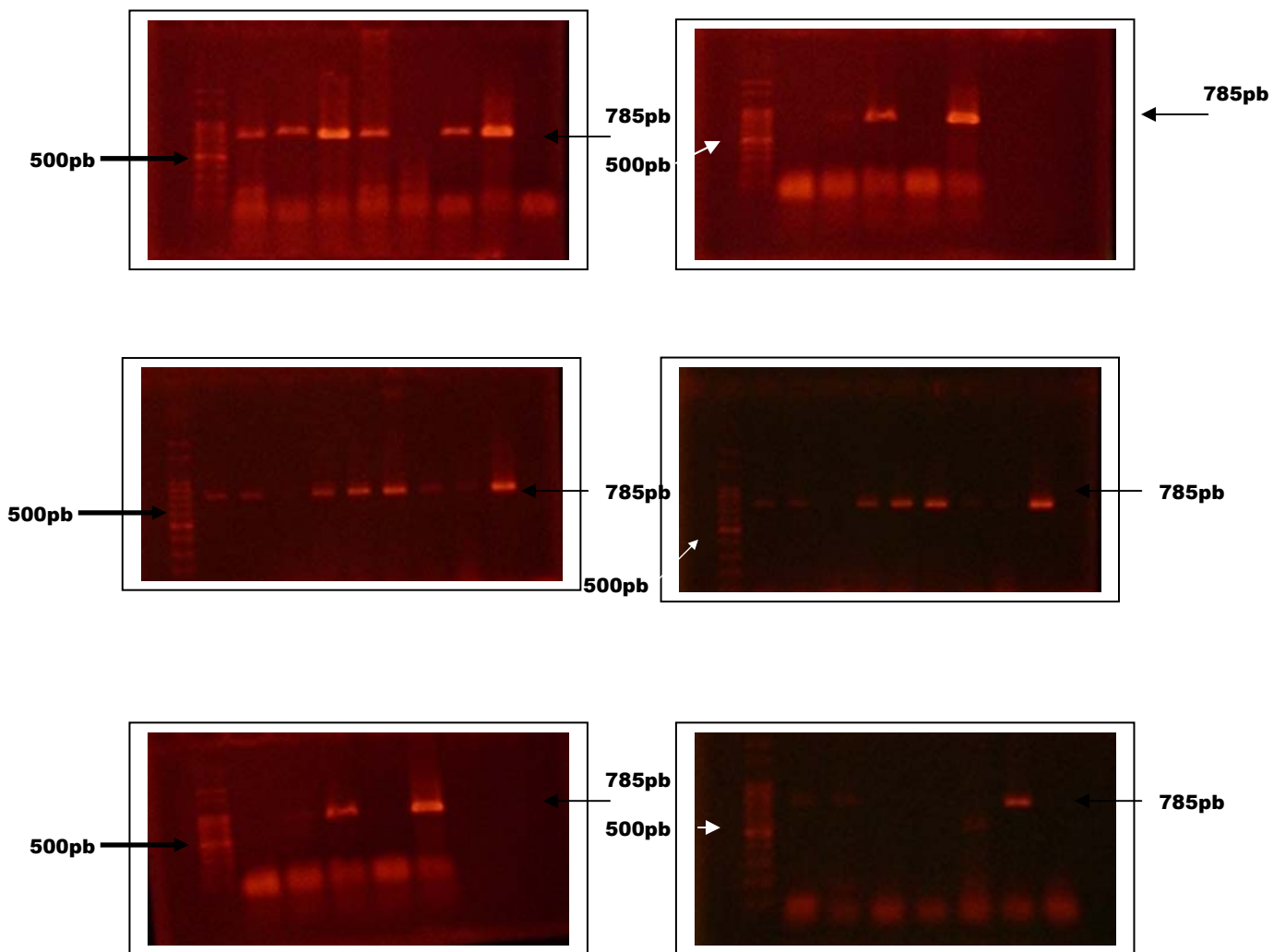


Figura 3A. Resultados dos amplicons obtidos na PCR-REAP para *Mycoplasma* spp. membros do GMM em isolados de conduto auditivo de bovinos estudados.

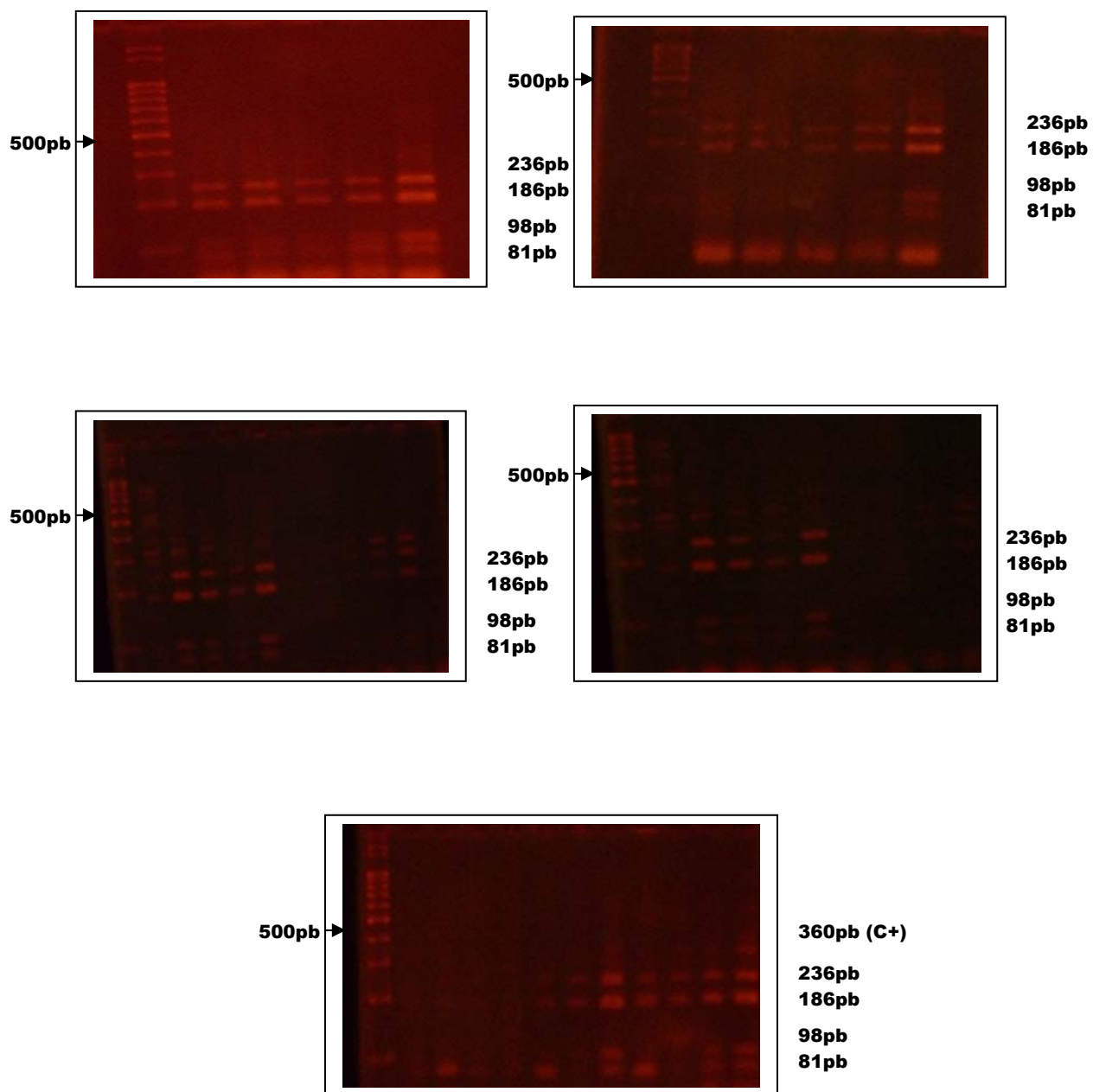


Figura 3B. Resultados dos fragmentos obtidos na PCR-REA, com restrição de endonuclease *AluI*, em isolados de conduto auditivo de bovinos estudados.

8.2 Resultados da PCR para MMMLC e MMMSC

Na padronização da PCR para cepas de MMMLC, verificou-se que estes primers amplificaram apenas as cepas de referência *MmmLC* (Y-goat), *MmmLC* (GM12) e *Mmc* (PG3). Assim somente foi possível visualizar um amplicon de 1049pb compatível com tais espécies (Figura 4), segundo protocolo descrito na literatura por Monnerat et al. (1999a). Devido a falta de reprodutibilidade verificada nas repetições com as cepas padrões, esta PCR não foi utilizada na separação dos isolados de campo positivos para *MmmLC* na IPI. Isto também foi verificado na PCR para *MmmSC*, onde nem com a cepa padrão PG1 foi possível padronizar o método. As duas PCR serão reproduzidas em estudos posteriores, visando maior elucidação na tipificação destes isolados de membros do GMM, presentes em conduto auditivo de bovinos.

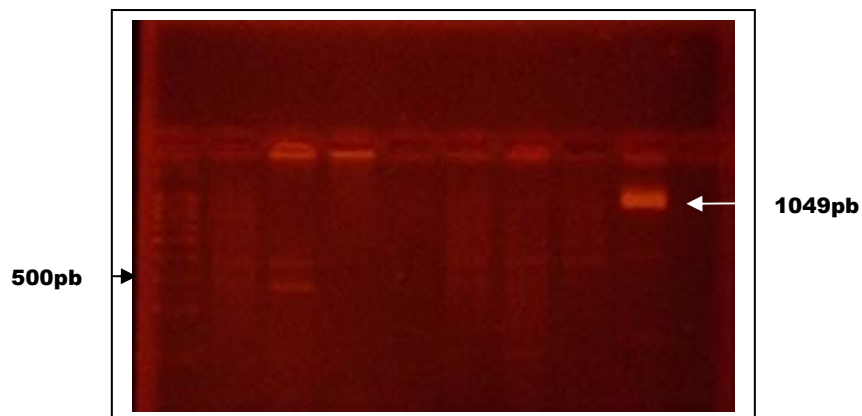


Figura 4. PCR específico para *MmmLC* e *Mmc* em cepas de referência do GMM.

9 DISCUSSÃO

A prevalência obtida para o GMM não foi baixa na IPI, mas na PCR-REA este valor duplicou, o que indica uma maior sensibilidade desta técnica em relação a anterior. A alta prevalência encontrada para o GMM por PCR-REA indicou que esta técnica é sensível, além de ser considerada específica para detectar este grupo em amostras de campo. Contudo, PCR-REA não se presta à diferenciação de subespécies do grupo, exceto para a cepa *MmmSC*, sendo um método de escolha para o diagnóstico da CBPP e triagem do GMM, em áreas com suspeita. Estes achados estão de acordo com estudos prévios de Pettersson et al. (1996ab) e Le Grand et al. (2004). Esses autores relataram também problemas para separar cepas do GMM, uma vez que as espécies *MmmLC*, *Mmc*, *Mcc*, *Mccp* e *Msp7* apresentam um mesmo padrão de bandas na PCR-REA, não sendo possível distingui-las. Contudo a espécie *MmmSC* quando submetida à análise por PCR-REA apresenta uma banda extra de 370pb que a diferencia das demais do GMM, devido a um polimorfismo na posição 426 do gene 16SrRNA. A PCR-REA tem sido relatada como muito específica para o GMM, não amplificando outras espécies comuns a bovinos como: *M. bovis genitalium*, *M. bovis rhinis*, *M. bovis*, *M. bovoculi* e *M. canis* (Le Grand et al. 2004). Persson et al. (1999a) ressaltaram que a detecção de *M. mycoides* SC após restrição de amplicons possui uma sensibilidade técnica estimada em 30 cópias de DNA por reação de amplificação. Em se tratando de tipificação de cepas do GMM pela técnica de IPI, são frequentes a presença de reações cruzadas entre as subespécies, o que dificulta a caracterização, embora esta possa ser utilizada como ferramenta para uma triagem de tipificação diagnóstica com ressalvas, necessitando de uma caracterização molecular complementar. Porém quando não se dispõe da ferramenta molecular para diagnóstico laboratorial, esta pode ser utilizada na separação dos dois principais subgrupos do GMM (*Mycoides* e *Capricolum*).

Em relação à classificação das cepas *MmmLC*, *Mmc* e *MmmSC*, esta exige técnicas de diagnósticos de alta especificidade, o que é difícil pela forte semelhança fenotípica e genotípica destas subespécies. Assim somente por técnica de IPI, não é possível distinguir cepas das subespécies *MmmLC* de *Mmc*. Isto se deve as fortes reações cruzadas entre estas espécies, conforme está frequentemente relatado na literatura científica (PETTERSSON et al., 1996; MONNERAT et al., 1999ab; PERSSON et al., 1999; LE GRAND et al., 2004; OIE, 2008), isto também é frequente com cepas de *M. capricolum capricolum* e *M. capricolum capripneumoniae* não sendo possível distinguir estas subespécies pela IPI, sendo necessária a PCR específica com base na lipoproteína de membrana *lppA*. Embora com suas limitações a tipificação por IPI pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica e esta técnica tem uma margem de segurança maior quando utilizada na tipificação de outras espécies de micoplasmas que não pertencem ao GMM, onde as reações cruzadas são menos frequentes (IMADA et al., 1987; NICHOLAS et al., 1996; KOKOTOVIC et al., 2000; VILEI; FREY, 2004; VILEI et al., 2006). Neste estudo a despeito de tratar-se de animais assintomáticos para micoplasmoses, tornou-se complexa a tipificação destas cepas, uma vez que, nos casos de surtos ou de animais com doença clínica, estes achados facilitam no direcionamento do diagnóstico laboratorial, pois algumas espécies do GMM causam síndromes específicas.

São raras as descrições de *MmmLC* em bovinos, e *Mmc* tem sido descrito causando doença somente em caprinos (OIE, 2008). Este fato dá suporte para que a espécie encontrada no nosso trabalho seja realmente *MmmLC*. Devido às fortes semelhanças genéticas entre estas duas subespécies, alguns autores tem sugerido o agrupamento destas em uma única espécie (PETTERSSON et al., 1996; MONNERAT et al., 1999a; VILEI et al., 2006), e mesmo com

uso de enzimas de restrição, não tem sido possível distinguir cepas de *MmmLC* e *Mmc* (PERSSON et al., 1999). Ressalta-se que *MmmLC* está mais relacionada filogeneticamente à *Mmc* do que com *MmmSC* (PETTERSSON et al., 1996ab; MONNERAT et al., 1999a; VILEI et al., 2006). Em relação a *M. capricolum* a tipificação das subespécies *Mcc* e *Mccp* são feitas principalmente através de SDS-PAGE e PCR-REA (MONNERAT et al., 1999b; OIE 2008), sabendo-se que *Mccp* não afeta bovinos, é mais provável que *M. capricolum* identificado neste trabalho seja a subespécie *capricolum* (*Mcc*), embora estudos moleculares mais aprofundados sejam necessários para esclarecer esta constatação.

A presença de micoplasmas patogênicos em conduto auditivo de ruminantes já tem sido reportado por vários autores (COTTEW; YEATS, 1982; DaMASSA, 1990; RIBEIRO et al., 1995ab; PEREIRA et al., 2003; AZEVEDO et al., 2006). Em alguns casos as presenças destes agentes têm sido relacionadas a micoplasmoses nestes animais (GIL et al., 1999; FRANCOZ et al., 2004; MERCIER et al., 2007). A problemática na padronização da PCR para diagnósticos de cepas de *MmmSC* tem sido relatadas por vários autores (MISEREZ et al., 1997; VILEI et al., 2000; LORENZON et al., 2000; WESTBERG et al., 2003; DEDIEU et al., 2005; GORTON et al., 2005; BISCHOF et al., 2006). Neste estudo a padronização da PCR para diagnóstico desta espécie não teve sucesso, devido a falhas na reprodução e adaptação de técnica previamente descrita. Assim posteriormente esta poderá ser reavaliada.

A dificuldade em tipificar isolados de campo é freqüente devido às semelhanças antigênicas das cepas e também pela presença de cepas intermediárias entre alguns sorotipos ou sorogrupos (LE GRAND et al., 2004; NICHOLAS et al., 1996; KOKOTOVIC et al., 2000; VILEI; FREY, 2004; VILEI et al., 2006), o que justifica as dificuldades encontradas, no presente estudo, em relação a tipificação. De acordo com os resultados encontrados para PCR-REA em lavados de ouvido de bovinos, neste estudo, demonstrou-se que neste sítio são encontradas várias espécies de *Mycoplasma* patogênicas, e que bovinos assintomáticos albergam cepas do GMM. Destacou-se neste estudo a presença das cepas *M. mycoides mycoides* LC e *M. capricolum*, por terem alto potencial patogênico para pequenos ruminantes, e de acordo com os resultados obtidos na PCR-REA pode-se inferir que é eficiente para investigações da presença de membros do grupo GMM em amostras de campo, destacando-se ainda que não foram amostras clínicas, cujo limite de detecção provavelmente deverá ser maior do que o encontrado neste estudo, uma vez que o número de microorganismos deverá ser maior. Além disso, como no Brasil a CBPP é exótica, esta PCR poderá ser utilizada para diagnóstico de animais suspeitos da doença, em casos de eminência de surtos. Os animais utilizados nesta pesquisa foram procedentes de uma região de exploração extensiva de bovinos de corte, onde, possivelmente, a coabitação de bovinos com caprinos e/ou ovinos pode ter contribuído para a circulação de cepas do GMM entre estes animais.

10 CONCLUSÕES

- A técnica de PCR-REA foi eficiente na detecção das amostras de *Mycoplasma* do GMM, presentes em conduto auditivo de bovinos.
- Nos resultados da PCR-REA, obteve-se uma prevalência maior de amostras positivas para o GMM, quando comparada a IPI.
- A técnica de PCR-REA foi mais eficiente em comparação com IPI no diagnóstico de membros do GMM, no presente estudo.
- Na IPI foi possível detectar as amostras *MmmLC* e *M. capricolum*, membros do GMM.
- Na PCR-REA dos isolados de ouvido de bovinos, foi possível comprovar a presença de cepas do GMM, através de um amplicon de 785pb.
- Nas isolados de ouvido de bovinos após restrição dos produtos da PCR com *AluI*, foram visualizados quatro amplicons de 81, 98, 186 e 236pb que são característicos do GMM.
- Nos isolados de ouvido de bovinos não foi detectado qualquer fragmento com tamanho de 370pb, compatível com *MmmSC*.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGBOYE, D.S.; HALBUR, P.G.; CAVANAUGH, D.L.; WERDIN, R.E.; CHASE, C.C.L.; MISKIMINS D.W.; ROSENBUSCH R.F. Immunohistochemical and pathological study of *Mycoplasma bovis*-associated lung abscesses in calves. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. 7:333-337. 1995.
- ALBERTSEN, B.E. Pleuropneumonia-Like organisms in the semen of Danish artificial insemination bulls. **Nordish Veterinaermedicin**. 7:169-201. 1955.
- ALBERTI, A.; ADDIS, M.F.; CHESSA, B.; CUBEDDU, T.; PROFITI, M.; ROSATI, S.; RUIU, A.; PITTAU, M. Molecular and genetic characterization of a *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. 18:41-51. 2006.
- ALLEN, J.W.; VIEL, L.; BATEMAN, K.G.; ROSENDAL, S.; SHEWEN, P.E; SHEARD, P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: association between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. **Canadian Journal Veterinary Research**. 55:341-346. 1991.
- ALLEN, J.W.; VIEL, L.; BATEMAN, K.G.; ROSENDAL, S.; SHEWEN, P.E. Cytological findings in bronchoalveolar fluid from feedlot calves: associations with pulmonary microbial flora. **Canadian Journal Veterinary Research**. 56:122-126. 1992.
- ASKA, G.; ERNO, H. Evallution of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to species rank *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) com. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**. 26:323-325. 1976.
- AYLING, R.D.; BASHIRUDDIN, S.E.; NICHOLAS, R.A.J. Mycoplasmas species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990-2000. **Veterinary Record**. 155:413-416. 2004.
- AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA, I.V.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; ARAÚJO, M.D'O.; RODRIGUES, A.R.O.; RIET-CORREA, F.; CASTRO, R.S. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. **Brazilian Journal Microbiology**. 37: 576-581. 2006.
- BARBER, DM; JONES, GE; WOOD, A. Microbial flora of the eye of cattle. **Veterinary Record**. 118(8):204-206. 1986.
- BARBOSA, V.P.; NASCIMENTO, E.R.; DANELLI, M.G.M.; NASCIMENTO, M.G.F.; SANTOS M.A.J.; LIGNON G.B.; RIBEIRO V.R. Differentiation of *Mycoplasma mycoides* types on the etiopathogeny of goat mycoplasmosis. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 7(1): 33-36. 2000.

- BASHIRUDDIN, J.B.; SANTIS P.; PERSSON P.; BALL H.; REGALLA J. Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC in bovine lung and lymph node tissues by culture, sandwich ELISA and pplymerase chain reaction systems. **Research in Veterinary Science**. 78:199-205. 2005.
- BIRNE, W.; FAGAN, J.; McCORMACK. *Mycoplasma bovis* arthritis as a sequel to respiratory disease in bought-in weanling in the Republic of Ireland. **Irish Veterinary Journal**. 54(10):516-519. 2001.
- BISCHOF, D.F.; VILEI, E.D.; FREY, J. Genomic differences between type strain PG1 and field strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type. **Genomics**. 88:633-641. 2006.
- BLANCHARD, A.; BROWNING, G. **Mycoplasmas: Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control**, Horizon Bioscience, U.K., 2005, 603p.
- BOOTHBY, J.T.; MUELLER, R.; JASPER, D.E.; THOMAS, C.B. Detecting *Mycoplasma bovis* in milk by enzyme-liked immunosorbent assay, using monoclonal antibodies. **American Jouranl Veterinary Research**. 47:1082-1084. 1996.
- BOUGHTON, E. *Mycoplasma bovis* mastitis. **Veterinary Bulletin**. 49(6):377-387. 1979.
- BRITTON, A.P.; RUHNKE, H.L.; MILLER, R.B.; JOHNSON, W.H.; LESLIE, K.E.; ROSEDAL, S. *In vitro* Exposure of bovine morulae to *Ureaplasma diversum*. **Canadian Journal Veterinary Research**. 51:198-203. 1987.
- BROWN, D.R.; ZACHER, L.A.; FARMERIE, W.G. Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. **Journal Bacteriology**. 186:3922-3927. 2004.
- BROWNING, G.F.; WHITHEAR, K.G.; GEARY, S.J., Vaccines to control mycoplasmosis, p.569-597. In: BLANCHARD, A., BROWNING, G., **Mycoplasmas: Molecular Biology pathogenicity and strategies for control**, Horizon Bioscience, U.K., 2005, 603p.
- BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TOMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. 59(6):1368-1375. 2007a.
- BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; BUIM, M.R.; MORENO, A.M.; PAIXÃO, R.; TOMENETSKY, J. Isolates of *Ureaplasma diversum* genotyped by single-enzyme amplified lenght polymorphism. **Brazilian Journal of Microbiology**. 38: 29-32. 2007b.
- CARDOSO, M. V.; GRASSO, L.; S TEFANO, E.; OKUDA, L. H.; CUNHA, R.A. F. Isolamento de *Ureaplasma diversum* e *Mycoplasma* spp. em casos de Vulvite Granular Bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 21(2):172-173. 1997.

CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L.M.P.S.; TEIXEIRA, S.R.; GENOVEZ, M.E. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. **Animal Reproduction Science**. 63:137-143. 2000.

CARDOSO, M.V.; SFORSIN, A.J.; SCARLLI, E.; TEIXEIRA, R.S.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F.R.; GENOVEZ, M.E. Importância do diagnóstico diferencial em um surto de pneumonia enzoótica bovina. **Arquivos Instituto Biológico**. 69(3):111-113. 2002.

CARDOSO, M.V. **Mycoplasma bovis, M. bovigenitalium e Ureaplasma diversum em touros**. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico. 2003. São Paulo. Tese. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 89p.

CARDOSO, M.V.; VASCONCELOS, S.A. Importância das micoplasmoses na infertilidade de touros. **Arquivos Instituto Biológico**. 71(2):257-265. 2004.

CARDOSO, M.V.; TEIXEIRA, S.R.; MIYASHIRO, S.; VASCONCELLOS, S.A.; GREGORY, L.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e central de inseminação artificial. **Arquivos Instituto Biológico**. 73(1):33-40. 2006.

CASTRO, R.S.; PESSOA, A.L.P.; MAIA, F.C.L.; TABOSA, H.C.; CAVALCANTE, M.I.; BARROS, M.S.R.M. Micoplasmoses em reprodutores empregados em programa de melhoramento genético no Estado de Pernambuco, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Veterinaria e Zootecnia**. 41, 247-256. 1989.

COSTA, A.L.; LEITE, R.C.; FACCINI, J.L.H. Preliminary investigations on transmission and life cycle of the ear mite of the genus *Raillietia* Trouessart (Acari:Gamasida) parasites of cattle. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. 87(1):97-100. 1992.

COTTEW, G.S.; YEATS, F.R. Occurrence of mycoplasmas in clinically normal goats. **Australian Veterinary Journal**. 57: 52-53. 1981.

COTTEW, G.S.; YEATS F.R. Mycoplasmas and mites in the ear of clinically normal goats. **Australian Veterinary Journal**. 59(3): 77-81. 1982.

COTTEW, G.S. Infections with mollicutes in sheep and goats. In: **Infektionen durch Mycoplasmatales**, ed. Gylstorff I, Ferdinand Enke, Stuttgart. p368-386. 1985.

D'ANGELIS, F.H.F.; NASCIMENTO, M.G.F.; RESENDE, O.A.; NASCIMENTO, E.R. 1994. Isolamento de *Mycoplasma* spp. de vacas com distúrbios reprodutivos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda, Pernambuco, 555p.

DAMASSA, A.J. The ear canal as a culture site for demonstration of mycoplasmas in clinically normal goats. **Australian Veterinary Journal**. 67: 267-269. 1990.

- DaMASSA, A.J.; BROOKS, D.L. The external ear canal of goats and others animals as a mycoplasma habitat. **Small Ruminant Research**, 4: 85-93. 1991.
- DaMASSA, A.J.; WAKENELL, P.S.; BROOKS, D.L. Mycoplasmas of goats and sheep. Review article. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. 4:101-113. 1992.
- DaMASSA, A.J. Prevalence of mycoplasmas and mites in the external auditory meatus of goats. **California Veterinarian**. 37:10-13,17. 1983.
- DAVIS, R.E.; WHITCOMB, R.F. Mycoplasmas, Rickettsiae, and Chlamydiae: possible relation to yellows diseases and other disorders of plants and insects. **Annual Review Phytopathology**. 9:119-154. 1971.
- DEDIEU, L.; RODRIGUES, V.B.; YAYA, A.; HAMADOU, B.; CISSE, O.; DIALLO, M.; NIANG, M. Gamma interferon-producing CD4 T-cells correlate with resistance to *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC infection in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 107:217-233. 2005.
- DYBVIG, K.; VOELKER, L.L. Molecular Biology of Mycoplasmas. **Annual Review Microbiology**. 50:25-57. 1996.
- DIENES, L. Morphology and nature of the pleuropneumonia group of organism. **Journal of Bacteriology**. 50:441-458. 1945.
- DEGIORGIS, M.P.; ABDO, EL.M.; NICOLET, J.; FREY, J.; MAYER, D.; GIACOMETTI, M. Immune responses to infections of *M. conjunctivae* in alpine ibex, alpine chamois, and domestic sheep in Switzerland. **Journal Wildlife Disease**. 36:265-271. 2000.
- DUARTE, E.R.; RESENDE, J.C.P.; ROSA, C.A.; HAMDAN, J.S. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Veterinary Medicine Series B**. 48:631-635. 2001a.
- DUARTE, E.R.; MELO, M.M.; HAMDAN, J.S. Epidemiological aspects of bovine parasitic otitis caused by *Rhabditis* spp. and/or *Raillietia* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**. 101: 45-52. 2001b.
- DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S. Otitis in cattle, an aetiological review. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, 51:1-7. 2004.
- DYER, N.; HANSEN-LARDY, L.; KROGH, D.; SCHAAN, L.; SCHAMBER, E. An outbreak of chronic pneumonia and polyarthritis syndrome caused by *Mycoplasma bovis* in feedlot bison (*Bison bison*). **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. 20: 369-371. 2008.
- FACCINI, J.L.H.; CONFALONIERI, V.E.C.; MASSARD, C.L.; SERRA-FREIRE, N.M. Situação do parasitismo por *Raillietia auris* (Leidy 1872) e referencia ao encontro de

Raillietia spp. em caprinos no Brasil. Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: 1976. 149p.

FACCINI, J.L.H.; LEITE, R.C.; COSTA, A.L. Description of *Raillietia flechtmani* sp.n. (Acari:Gamasida). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 87(1):95-96. 1992a.

FACCINI, J.L.H.; FONSECA, A.D.; COSTA, A.L.; LEITE, R.C. Distribuição geográfica e prevalência das espécies do gênero *Raillietia* Trouessart em bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 1(2): 109-110. 1992b.

FACCINI, J.L.H.; RIBEIRO, V.R. *Raillietia caprae* (Acari:Raillietidae) and *Psoroptes ovis* (Acari: Psoroptidae) in the ear of goats in the state of Rio de Janeiro, southeast Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 17(1):59-61. 2008.

FILHO, R.S.A.; VIANNA, S.S.S.; PEREIRA, J.R. Aspectos epidemiológicos de *Raillietia auris* (Leidy 1872) Trouessart 1902 (Mesostigmata: Raillietidae) no vale do paraíba e região serrana, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 5(1):33-38. 1996.

FLECHTMANN, C.W. **Ácaros de importância médico veterinária**. 1977. São Paulo, Nobel, 192p.

FONSECA, A.H. **Biologia e Ecologia de *Raillietia auris* (Leidy 1872) (Acari:Mesostigmata)**. 1983. 54p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

FONSECA, A.H.; FACCINI, J.L.H.; MASSARD, C.L. *Raillietia caprae* (Acari:Mesostigmata) em caprinos e ovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 3:29-31. 1983.

FOSTER, A.P.; NAYLOR, R.D.; HOWIE, N.M.; NICHOLAS, R. A.J.; AYLING, R.D. *Mycoplasma bovis* and otitis in dairy calves in the United Kingdom. 2007. **The Veterinary Journal**. doi:10.1016/j.tvjl.2007.10.020

FOX, L.K.; KIRK, J.H.; BRITTEN, A. *Mycoplasma mastitis*: A review of transmission and control. **Journal Veterinary Medicine Series B**. 52:153-160. 2005.

FRANCOZ, D.; FECTEAU, G.; DESROCHERS, A.; FORTIN, M. Otite media in dairy calves: A retrospective study of 15 cases (1987 to 2002). **Canadian Veterinary Journal**. 45: 661-666. 2004.

FREY, J.; CHENG, X.; MONNERAT, M.P.; ABDO, E.M.; KRAWINKLER, M.; BOLSKIE, G.; NICOLET, J. Genetic and serological analysis of the immunogenic 67-kDa lipoprotein of *Mycoplasma* sp. bovine group 7. **Research in Microbiology**. 149:55-64. 1998.

GARNIER, M.; FOISSAC, X.; GAURIVAUD, P.; LAIGRET, F.; RENAUDIN, J.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J.M. Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. **Academic Science Paris Sciences de la vie/Life Sciences**. 324:923-928. 2001.

GEVAERT, D. The importance of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease. **Tijdschrift voor Diergeneeskunde**. 15:124-126. 2006.

GHADERSOHI, A.; HIRST, R.G.; FORBES-FAULKENER, J.; COELEN, R.J. Preliminary studies on the prevalence of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle in Australia. **Veterinary Microbiology**. 65:185-194. 1999.

GIACOMETTI, M.; NICOLET, J.; FREY, J.; KRAWINKLER, M.; MEIER, W.; WELLE, M.; JOHANSSON, K.E.; DEGIORGIS, M.P. Susceptibility of alpine ibex to conjunctivitis caused by inoculation of a sheep-strain of *Mycoplasma conjunctivae*. **Veterinary Microbiology**. 61: 279-288. 1998.

GIACOMETTI, M.; NICOLET, J.; JOHANSSON, K.E.; NAGLIC, T.; DEGIORGIS, M.P.; FREY, J. Detection and identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivite by PCR based on the 16SrRNA gene. **Journal Veterinary Medicine**. 46:173-180. 1999.

GIACOMETTI, M.; JANOVSKY, M.; JENNY, H.; NICOLET, J.; BELLOY, L.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, E.; FREY, J. *Mycoplasma conjunctivae* infection is not maintained in alpine chamois in eastern switzerland. **Journal of Wildlife Disease**. 38(2):297-304. 2002.

GIL, M.C.; MENDOZA, M. H.; REY, J.; ALONSO, J.M.; POVEDA, J.B.; MENDOZA, J.H. Isolation of *Mycoplasmas* from the external ear canal of goats affected with contagious agalactia. **The Veterinary Journal**. 158 (2), 152-154. 1999.

GONZALEZ, R.N.; JAYARAO, B.M.; OLIVER, S.P.; SEARS, P.M. Pneumonia, arthritis and mastitis in dairy cows due to *Mycoplasma bovis*. In: National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings. 1993. p.178-185.

GONZALEZ, R.N.; WILSON, D.J. Mycoplasma mastitis in dairy herds. **Veterinary Clinical North American, Food Animal Practice**. 19:199-221.2003.

GORTON, T.S.; BERNETT, M.M.; GULL, T.; FRENCH, R.A.; LU, Z.; KUTISH, G.F.; ADAMS, L.G.; GEARY, S.J. Development of real-time assays specific for *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony. **Veterinary Microbiology**. 111:51-58. 2005.

GOURLAY, R.N.; STOTT, E.J. Isolation of *Mycoplasma agalactiae* var. *bovis* and infectious bovine rhinotracheitis virus from an outbreak of mastitis in France. **Veterinary Record**. 7:534-535. 1974.

GRAY, S.M.; BANERJEE, N. Mechanisms of arthropods transmission of plant and animal viruses. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 63 (1), 128-148. 1999.

GREGORY, L.; CARDOSO, M.V.; BIRGEL, Jr. E.H.; TEIXEIRA, S.R.; SOUZA, R.M.; PACHECO, W.A.; BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa dos caprinos causada por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos, criados no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo. 70(2):179-181. 2003.

GREGORY, L.; CARDOSO, M.V.; BIRGEL, Jr. E.H.; TEIXEIRA, S.R.; LARA, M.C.C.S.H.; RIZZO, H.; ANGELINI, A.; MENEGHINI, R.C.M.; BENESI, F.J. Ocorrência de artrite em ovinos causada por *Mycoplasma* spp. **Arquivos do Instituto Biológico**. 71(2):233-235. 2004.

HALE, H.H.; HELMBOLTD, C.F.; PLASTRIDGE, W.N.; STULA, E.F. Bovine mastitis caused by mycoplasma species. **Cornell Veterinary**. 52:582-591. 1962.

HAZELL, S. L.; CARRIGAN, M. J.; COCKRAM, F. A. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in the ears of goats associated with an outbreak of systemic mycoplasmosis. **Australian Veterinary Journal**. 62: 421–2. 1985.

HIROSE, K.Y.; KAWASAKI, K.; KOTANI, A.; TANAKA, A.; ABIKO, K.; OGAWA, H. Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. **Journal Veterinary Medicine Science**. 63:691-693. 2001.

HUM, S.; KESSELL, A.; DJORDJIEVIC, S.; RHEINBERGER, R.; HORNTZKY, W.; FORBES, W.; GONSALVES, J. Mastitis, polyarthritis and abortion caused by *Mycoplasma* sp. bovine group 7 in dairy cattle. **Australian Veterinary Journal**. 78:744-750. 2000.

IMADA, Y.; UCHIDA, I.; HASHIMOTO, K. Rapid identification of *Mycoplasma* by indirect immunoperoxidase test using small square filter paper. **Journal Clinical Microbiology**, 25, 17-21. 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>

INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY—Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. 1997. Minutes of the interim meeting, July 1996, Orlando, USA. **International Journal Systematic Bacteriology**. 47:911–914.

JANOVSKY, M.; FREY, J.; NICOLET, J.; BELLOY, L.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, E.; GIACOMETTI. *Mycoplasma conjunctivae* infection is self-maintained in the Swiss domestic sheep population. **Veterinary Microbiology**. 83:11-22. 2001.

JACKSON, G.; BOUGHTON, E. A mild outbreak of bovine mastitis associated with *Mycoplasma bovis*. **Veterinary Record**. 129:444-446. 1991.

JASPER, D.E. *Mycoplasmas*: Their role in bovine disease. **Journal American Veterinary Medicine**. 151:1650-1655. 1967.

JENSEN, R.; MAKI, L.R.; LAUERMAN, L.H. Cause and pathogenesis of middle ear infection in young feedlot cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**. 182:967-972. 1983.

JOHANSSON, K.E.; PETTERSSON, B. In: RAZIN S., HERRMANN R., Eds., **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher. P.1-30), 2002.

JUBB, TF; VASSALLO, RL.; WROTH, RH. Suppurative otitis in cattle associated with ear mites (*Raillietia auris*). **Australian Veterinary Journal**. 70(9):354-356. 1993.

KOKOTOVIC, B.; BOLSKE, G.; AHRENS, P.; JOHANSSON, K.E. Genomic variations of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* detected by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. **FEMS, Microbiology Letters**, 184:63-68. 2000.

KRAMETTER-FROETSCHER, R.; LESCHNIK, M.; HOEGLER, S.; LOEWENSTEIN, M.; BAUMGARTNER, W. 2004. Occurrence of the ear-mite *Raillietia auris* in cattle in Austria. **The Veterinary Journal**. <doi:10.1016/j.tvjl.2004.09.014>

LAMM, C.G.; MUNSON, L.; THURMOND, M.C.; BARR, B.C.; GEORGE, L.W. *Mycoplasma* otitis in California calves. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. 16:397-402. 2004.

LANGFORD, E.V.; DORWARD, W.J. A mycoplasma isolated from cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. **Canadian Journal Comparative Medicine and Veterinary Science**. 33:275-279. 1969.

LE GRAND, D.; SARAS, E.; BLOND, D.; SOLSONA, M.; POUMARAT, F. Assessment of PCR for routine of the *Mycoplasma mycoides* Cluster in ruminants. **Veterinary Research**. 35, 635-649. 2004.

LE GRAND, D.; POUMARAT, F.; MARTEL, J.L. Infection génitale à *Ureaplasma diversum*: enquête chez les bovins en France. **Veterinary Research**. 26:11-20. 1995.

LEITE, R.C.; NUNES, V.A.; FACCINI, J.L.H.; LOPES, C.W.G.; NUNES, I.; COSTA, A.L. Aspectos clínicos da railietiose bovina. **Arquivos da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro**. 12(1-2): 83-91. 1989.

LEITE, R.C.; NUNES, V.A.; NUNES, I.J.; COSTA, A.L.; FACCINI, J.L.H.; LOPES, C.W.G. Oite parasitária bovina por nematóides rhabditiformes: aspectos epidemiológicos e clínico. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 15(2):49-51. 1993.

LEITE, R.C.; LEITE, R.C.; FACCINI, J.L.H. Diagnóstico e tratamento da oite parasitária por nematóides rhabditiformes em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia**. 3(1):69-70. 1994.

- LIBERAL, M.H.T.; ROMIJN, P.C.; VOLLU, E.W. Presença de *Mycoplasma* spp. em pulmão de bezerro de até um ano de idade. Cantagalo-Niterói-RJ, **Comunicado Técnico PESAGRO**, 8(1:3), 1982.
- LO, S.C.; DAWSON, M.S.; WONG, D.M.; NEWTON, P.B.III; SONODA, M.A.; ENGLER, W.F.; WANG, R.Y.; SHIH, J.W.; ALTER, H.J.; WEAR, D.J. Identification of *Mycoplasma* incongnitus infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 41:601-616. 1989.
- LORENZON, S.; DAVID, A.; NADEW, M.; WESONGA, H.; THIAUCOURT, F. Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. **Molecular and Cellular Probes**, 14:205-210. 2000.
- LYSNYANSKY, I.; LEVISOHN, S.; BERNSTEIN, M.; KENIGSWALD, G.; BLUM, S.; GERCHMAN, I.; ELAD, D.; BRENNER, J. Diagnosis of *Mycoplasma conjunctivae* and *Chlamydophila* spp. in an episode of conjunctivitis/keratoconjunctivitis in lambs. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, 62 (3-4):79-82. 2007.
- MACKIE, D.P.; FINLAY, D.; BRICE, N.; BALL, H.J. Mixed mycoplasma mastitis outbreak in a dairy herd. **Veterinary Record**. 147:355-336. 2000.
- MAEDA, T.; SHIBAHARA, T.; KIMURA, K.; WADA, Y.; SATO, K.; IMADA, Y.; ISHIKAWA, Y.; KADOTA, K. *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in Bull calves. **Journal Comparative Pathology**. 129: 100-110. 2003.
- MANILOFF, J. 2002. Phylogeny and evolution. In: S. RAZIN; R. HERRMANN. (Eds.), **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas** (pp.31e43). New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher. 2002.
- MARKHAM, P.F.; NOORMOHAMMADI, A.H. 2005, Diagnosis of mycoplasmosis in animals, p.355-382. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. **Mycoplasmas: Molecular Biology pathogenicity and strategies for control**, Horizon Bioscience, U.K., 2005, 603p.
- MARQUES, L.M.; BUZINHANI, M.; OLIVEIRA, R.C.; YAMAGUTI, M.; FERREIRA, J.B.; NETO, R.L.; TIMENETSKY, J. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of calves in Brazil. **The Veterinary Record**. 161 (17):699-700. 2007.
- MARTINS, W.Jr.; NUNES, I.J.; RIBEIRAL, L.A.; ROSAZ, C.E.E.; NUNES, V.A. Nota sobre a ocorrência de *Rhabditis* (Nematoda:Rhabditidae) relacionados com otite em bovinos na região geoeconômica de Brasília, DF. **Ciência Cultura**. 23:248-249. 1971.
- MERCIER, P.; PELLET, M.P.; MORIGNAT, E.; CALAVAS, D.; POUMARAT, F. Prevalence of mycoplasmas in the external ear canal of goats: Influence of the sanitary status of the herd. **Small Ruminant Research**. 73: 296-299. 2007.

- METTIFOGO, E.; NASCIMENTO, E.R.; MULLER, E.E.; NASCIMENTO, M.G.F.; FREITAS, J.C. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. **Revista Brasileira Medicina Veterinaria**. 18:22-25. 1996.
- MISEREZ, R.; PILLOUD, T.; CHENG, X.; NICOLET, J.; GRIOT, C.; FREY, J. Development of a sensitive nested PCR method for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. **Molecular and Cellular Probes**, 11:103-111. 1997.
- MONNERAT, M.P.; THIAUCOURT, F.; POVEDA, J.B.; NICOLET, J.; FREY, J. Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC e *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 6 (2): 224-230. 1999a.
- MONNERAT, M.P.; THIAUCOURT, F.; POVEDA, J.B.; NICOLET, J.; FREY, J. Comparative analysis of the *lppA* locus in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. **Veterinary Microbiology**. 69:157-172. 1999b.
- MULIRA, G.L.; SAUNDERS, J.R. Humoral and secretory antibodies to *Ureaplasma diversum* in heifers following subcutaneous vaccination and vaginal infection. **Canadian Journal Veterinary**. 58:104-108. 1994.
- NASCIMENTO, M.G.R.; NASCIMENTO, E.R. Estocagem e sobrevivência de várias espécies de micoplasmas a -20°C. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. Belém, p.307. 1984.
- NASCIMENTO, E.R.; NASCIMENTO, M.G.F.; FREUNDT, E.A.; ANDERSEN, H. Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. **British Veterinary Journal**, 142: 246-257. 1986.
- NASCIMENTO, E.R.; NASCIMENTO, M.G.F.; YAMAMOTO, R. Patogenicity study in goats of *Mycoplasma mycoides* strain 108/A2 isolated in Brazil. In: Proc. VIII INTERN. CONG. INTERN. ORGANIZ. MYCOPLASMOL. (IOM). Istambul, Turquia. 501-502. 1990.
- NASCIMENTO, M.G.F.; D'ANGELIS, F.H.F.; NASCIMENTO, E.R.; RESENDE, O.A.; LIGNON, G.B. *Mycoplasma bovirhinis* em muco vaginal de novilhas. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 20(5): 210-214. 1998.
- NASCIMENTO, M.G.F.; D'ANGELIS, F.H.F.; NASCIMENTO, E.R.; RESENDE, O.A. Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos. **Acta Scientiae Veterinária**. 33(2):195-199. 2005.
- NAYAK, N.C.; BHOUMIK, M.K. Isolation and characterization of mycoplasmas from septicemic polyarthritis of young goats. **Indian Veterinary Journal**. 193-6. 1990.
- NETO, J.B.A.; SÁ, F.B.; BUZINHANI, M.; TIMENETSKY, J.; MOTA, R.A.; ALMEIDA, M.Z. Ocorrência de *M. conjunctivae* em ovinos sadios e com ceratoconjuntivite infecciosa, no Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**. 71(1):79-81. 2004.

NICHOLAS, R.A.; SANTINI, F.G.; CLARK, K.M.; PALMER, N.M.A.; De SANTIS, P.; BASHIRUDDIN, J.B. A comparison of serological tests and Gross lung pathology for detecting contagious bovine pleuropneumonia in two groups of Italian cattle. **Veterinary Record**. 139:89-93. 1996.

NICHOLAS, R.A.; AYLING, R.D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. **Research Veterinary Science**. 74:105-112. 2003.

NICHOLAS, R.A.J.; LIN, Y.C.; SACHSE, K.; HOTZEL, H.; PARHAM, K.; McAULIFFE L.; MILES, R.J.; KELLY, D.P.; WOOD, A.P. Proposal that the strains of the *Mycoplasma* ovine/caprine serogroup 11 be reclassified as *Mycoplasma bovis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 58:308-312. 2008.

NIENHAUS, F.; SIKORA, R.A. Mycoplasmas, spiroplasmas and rickettsia-like organisms as plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**. 17:37-58. 1979.

NOCARD, E.; ROUX, E. Le microbe de la péripneumoniae. **Annual Institute Pasteur**. 12:240-262. 1898.

NUNES, I.J.; MARTINS, JR. W.; NUNES, V.A.; LEITE, R.C. 1972. Da presença de *Raillietia* sp. (Mesostigmata Raillietidae) no conduto e na bula timpânica de bovinos na região de Brasília-DF. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 13, 1972, **Anais**..Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, p.252. 1972.

NUNES, I.J.; MARTINS, JR W.; NUNES, VA; LEITE, RC. Ocorrência de *Raillietia auris* (Leidy 1872) Trouessart, 1902 em bovinos da região geoeconômica de Brasília, DF. **Arquivos Escola Veterinária**, UFMG. 27(3):375-383. 1975.

OLIVEIRA FILHO, B.D.; PORTO, R.N.G.; GAMBARINI, M.L.; KUNZ, T.L.; FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T.; SOUSA, A.P.F. Isolamento de *Ureaplasma diversum* em muco vulvovaginnal de vacas leiteiras repetidoras de estro no Estado de Alagoas, Brasil. **Archives of Veterinary Science**. 10(2):151-156. 2005.

ONOVIRAN, O.; TRUSCOTT, R.B.; FISH, N.A.; BARKER, C.A.V.; RUHNKE, H.L. The recovery of mycoplasmas from the genital tracts of bulls in artificial breeding units in Ontario. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. 39:474-475. 1975.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). **Contagious Caprine Pleuropneumonia**. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines, 5ed. 2008a.1000-12. Disponível em: <<<http://www.oie.int>>>

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOTIAS (OIE), **Contagious Bovine Pleuropneumonia**. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines, 5ed. 2008b. 712-24. Disponível em: <www.oie.int/list>

- PADILHA, T.N.; FACCINI, J.L.H. 1982. Doenças parasitárias dos caprinos nas regiões áridas e semi-áridas do Nordeste brasileiro, Petrolina-PE, **EMBRAPA-CPATSA**, documento 17.48p.
- PEREIRA, L.O.; DANELLI, M.G.M.; MAZUR, C.; GALLER, R. Identificação molecular de *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* SC isolado do conduto auditivo externo de caprinos clinicamente saudáveis. **Ciência Rural**. 33(2): 367-368. 2003.
- PEREIRA M.G. **Epidemiologia Teoria e Prática**. 7a. reimp. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 596p. 2003.
- PERSOON, A.; PETERSSON, B.; BOLSKE, G.; JOHANSSON, K.E. Diagnosis of contagious Bovine Pleuropneumonia by PCR-laser-induced fluorescence and PCR-restriction endonuclease analysis based on the 16SrRNA genes of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. **Journal of Clinical Microbiology**. 37 (12) :3815-3821. 1999.
- PETIT, T.; SPERGSER, J.; AURICH, J.; ROSENGARTEN, R. Prevalence of Chlamydiaceae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**. 127:325-333. 2008.
- PETERSSON, B.; JOHANSSON, K.E.; UHLÉN, M. Sequence analysis of 16SrRNA from *Mycoplasmas* by direct solid-phase DNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**. 60 (7): 2456-2461. 1994.
- PETERSSON, B.; LEITNER, T.; RONAGHI, M.; BOLSKE, G.; UHLÉN, M.; JOHANSSON, K.E. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* Cluster as determined by sequence analysis of the 16SrRNA genes from the two rRNA operons. **Journal of Bacteriology**. 178 (14): 4131-4142. 1996a.
- PETERSSON, B.; UHLÉN, M.; JOHANSSON, K.E. Phylogeny of some *Mycoplasmas* from ruminants based on 16SrRNA sequence and definition of a new Cluster within the Hominis Group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46 (4): 1093-1098. 1996b.
- PETERSSON, B.; BOLSKE, G.; THIAUCOURT, F.; UHLÉN, M.; JOHANSSON, K.E. Molecular evolution of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strains, based on polymorphisms in the 16S rRNA genes. **Journal Bacteriology**. 180:2350-2358. 1998.
- PHILIP, C.B.; BURGDORFER, W. Arthropod vectors as reservoirs of microbial disease agents. **Annual Review Entomology**. 6: 391-412. 1961.
- PRETTO, L.G.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; METTIFOGO, E.; BUZIHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 21(4): 143-145. 2001.
- PFUTZNER, H.; SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. **Revue Scientifique et Technique**. 15:1477-1494. 1996.

PYLE, L.E.; TAYLOR, T.; LLOYD, R.; FINCH, L.R. Genomic maps of some strains within the *Mycoplasma mycoides* cluster. **Journal of Bacteriology**. 172(12):7265-7268. 1990.

RAZIN, S. Molecular biology and genetics of micoplasmas (*Mollicutes*). **Microbiology Review**. 49: 419-455. 1985.

RAZIN, S.; TULLY, J.G., **Molecular and diagnostic Procedures in Mycoplasmology**, v.1, Academic Press, Califórnia, 1995, 481p.

RAZIN, S.; TULLY, J.G. **Molecular and diagnostic Procedures in Mycoplasmology**, v.2, Academic Press, Califórnia, 1996, 463p.

RAZIN, S.; TULLY J.G. **Methods in mycoplasmology: mycoplasmas characterization**, v1, New York, 1983, 504p.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62 (4):1094-1156. 1998.

REBOUÇAS, M.M; FUGII, T.U.; AMARAL, V.; SANTOS, S.M. Ocorrência da espécie *Raillietia flechtmanni* Faccinni, Leite e Costa, 1991 (Acari: Mesostigmata) em búfalos, no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia**. 2(1):65-66. 1993.

RIBEIRO, V.R.; NASCIMENTO, E.R.; FACCINI, J.L.H.; NASCIMENTO, M.G.F.; LIGNON, G.B. An improved method for the recovery of mycoplasmas from the external ear canal of goats. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. 9(2): 156-8. 1997.

RIBEIRO, V.R.; NASCIMENTO, E.R.; FACCINI, J.L.H.; NASCIMENTO, M.G.F.; LIGNON, G.B. Ocorrência de micoplasmas em caprinos através das técnicas de imunofluorescência direta e inibição do crescimento. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 17: 26-28. 1995a.

RIBEIRO, V.R.; NASCIMENTO, E.R.; FACCINI, J.L.H.; NASCIMENTO, M.G.F.; LIGNON, G.B. Presença de micoplasma em exemplares de *Raillietia caprae* coletados do conduto auditivo externo de caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 17: 122-124. 1995b.

RODRÍGUEZ, F.; BRYSON, D.G.; BALL, H.J.; FORSTER, F. Pathological and immunohistochemical studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. **Journal Comparative Pathology**. 115:151-162. 1996.

RODRÍGUEZ, J.L.; POVEDA, J.B.; RODRÍGUEZ, F.; MONTEROS, A.E.L.; RAMÍREZ, A.S.; FERNÁNDEZ, A. Ovine infectious keratoconjuntivite caused by *Mycoplasma agalactiae*. **Small Ruminant Research**. 22:93-96. 1996.

ROSENGARTEN, R.; CITTI, C.; The role of ruminant mycoplasmas in systemic infection. In: STIPKOVITS L., ROSENGARTEN R., FREY J.(Eds). **Mycoplasmas of Ruminants:Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics**. Vol.3, Brussels:European Comission. p.14-17. 1999.

ROSSINI, A.J., **Contribuição ao estudo de micoplasmose bovina: isolamento de *M.bovis* de bezerros acometidos de pneumonia**. Tese. São Paulo. Instituto de Ciências Biológicas. USP. 1978.

ROTTEM, S. Interactions of mycoplasmas with host cells. **Physiology Review**. 83:417-432. 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning laboratory manual**. NY, USA: Cold Spring Harbor.

SAMPAIO, I.B. M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**, 2ed., Belo Horizonte. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 264p.

SANTINI, F.G.; VISAGGIO, M.; FARINELLI, G.; DI FRANCESCO, G.; GUARDUCCI, M.; D'ANGELO, A.R.; SCACCHIA, M.; DI GIANNATAE, E. Pulmonary sequestrum from *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* SC in a domestic buffalo; isoation, anatomo-histopathology and immuno-histochemistry. **Veterinaria Italiana**. 4:4-10. 1992.

SANTOS, A.C.G.; FACCINI, J.L.H. Estudo seccional da piolheira caprina causada por *Bovicola caprae* (Railliet) (Trichodectidae:Mallophaga) na região do semiárido do Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 5(1):43-46. 1996.

SANTOS, S.B.; NASCIMENTO, E.R.; FACCINI, J.L.H.; BARRETO, M.L.; PEREIRA, V.L.A. Potentially patogenic mycoplasmas in the external ear canal of clinically normal cattle in southeast Brazil: first report. **Brazilian Journal Microbiology**. Prelo,v.n.2008.

SERVIÇO DE INFORMAÇÃO DA CARNE-SIC, Disponível em: <<http://www.sic.org.br/produção#asp>>. Acesso 2009.

SINGH, V.P.; SRIVASTAVA, N.C.; KUMAR, M.; SUNDER, M.J.; VARSHNEY, J.P. Isolation and characterisation of an Indian strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* type LC from a case of caprine arthritis. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease**. 27:273-284. 2004.

SIRAND-PUGNET, P.; CITTI, C.; BARRÉ, A.; BLANCHARD, A. Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. **Research in Microbiology**. 158:754-766. 2007.

SNOWDER, G.D.; VAN VLECK, L.D.; CUNDIFF, L.V.; BENNETT, G.L. Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calve. **Journal Animal Science**. 83:507-518. 2005.

SRIVASTAVA, N.C.; THIAUCOURT, F.; SINGH, V.P.; SUNDER, J.; SINGH, V.P. Isolation of *Mycoplasma mycoides* small colony type from contagious caprine pleuropneumonia in India. **Veterinary Record**. 147:520-521. 2000.

STALHEIM, O.H.V.; STONE, S.S. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* from arthritis cattle in Iowa and Nebraska. **Journal Clinical Microbiology**. 2(3):169-172. 1975.

- TARDY, F.; MERCIER, P.; SOLSONA, M.; SARAS, E.; POUMARAT, F. *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Large Colony type isolates from healthy and diseased goats: prevalence and typing. **Veterinary Microbiology**. 2007. [doi:10.1016/j.vetmic.2006.12.002](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.002).
- TENK, M. **Examination of Mycoplasma bovis infection in cattle**. Doctoral Thesis, Szent István University, Postgraduate School of Veterinary Science, Budapest, 2005. 70p.
- TER LAAK, E.A.; NOORDERGRAAF, J.H.; BOOMSLUITER, E. The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows. **Zentralbl. Veterinarmed.B.** 39:610-616. 1992a.
- TER LAAK, E.A.; NOORDERGRAAF, J.H.; DIELTJES, R.P. Prevalence of mycoplasmas in the respiratory tracts of pneumonic calves. **Zentralbl. Veterinarmed. B.** 39:553-562. 1992b.
- TER LAAK, E.A.; NOORDERGRAAF, J.H.; VERSCHURE, M.H. Susceptibilities of *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma dispar* and *Ureaplasma diversum* strains to antimicrobial agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 37(2):317-321. 1993.
- THIAUCOURT, F.; ROGER, F. 2005. Biodiversity of mycoplasmas and molecular epidemiology, p.415-437. In: Blanchard A.; Browning G. **Mycoplasmas: Molecular Biology pathogenicity and strategies for control**, Horizon Bioscience, U.K., 2005, 603p.
- THOMAS, L.H.; HOWARD, C.J.; STOTT, E.J.; PARSONS, K.R.. *Mycoplasma bovis* infection in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. **Veterinary Pathology**. 23:571-578. 1986
- THOMAS, L.H.; HOWARD, C.J.; PARSONS, K.R.; ANGER, H.S. Growth of *Mycoplasma bovis* in organ cultures of bovine foetal trachea and comparison with *Mycoplasma dispar*. **Veterinary Microbiology**. 13:189-200. 1987.
- TULLY, J.G; BOVE, J.M.; LAIGRET, F.; WHITCOMB, R.F. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. **International Journal Systematic Bacteriology**. 43:378-85. 1993.
- VASCONCELOS, A.T.; FERREIRA, H.B.; BIZARRO, C.V., et al. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. **Journal Bacteriology**. 187: 5568-5577. 2005.
- VIANNA, F.P.; CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E.; CAMPOS, F.R.; TEIXEIRA, S.R.; MIYASHIRO. Relato de infertilidade de touros da raça Nelore relacionada à presença de *Ureaplasma diversum* e *Histophilus somni*. **Arquivos Instituto Biológico**. 71:1-749. 2004.
- VILEI, E.M.; ABDO, EL-MOSTAFA; NICOLET, J.; BOTELHO, A.; GONÇALVES, R.; FREY, J., Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. **Microbiology**. 146:477-486. 2000.

- VILEI, E.M.; FREY, J. Differential clustering of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains by PCR-REA of the *bgl* locus. **Veterinary Microbiology**. 100:283-288. 2004.
- VILEI, E.M.; FREY, J. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: Its impact on H₂O₂ production and virulence. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 8(1):85-92. 2001.
- VILEI, E.M.; KORCZAK, B.M.; FREY, J. *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. **Veterinary Research**. 37:779-790. 2006.
- WALZ, P.H.; MULLANEY, T.P.; RENDER, J.A.; WALKER, R.D.; MOSSER, T.; BAKER, J.C. Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. **J. Veterinary Diagnostic Investigation**. 9:250-254. 1997.
- WEISBURG, W.G.; TULLY, J.G.; ROSE, D.L.; PETZEL, J.P.; OYAIZU, YANG, D.; MANDELCO, L.; SECHREST, J.; LAWRENCE, T.G.; VAN ETTEN, J.; MANILOFF, J.; WOESE, C.R. A phylogenetic analysis of the micoplasmas: basis for their classification. **Journal Bacteriology**. 171, 6455-6467. 1989.
- WESTBERG, J.; PERSSON, A.; HOLMBERG, A.; GOESMANN, A.; LUNDEBERG, J.; JOHANSSON, K.E.; PETTERSSON, B.; UHLÉN, M. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). **Genome Research**. 14:221-227. 2003.
- WHITCOMB, R.F.; BOVÉ, J.M.. Mycoplasma-plant-insect interrelationships.p.21-25. In: RAZIN S.; TULLY J.G. **Methods in Mycoplasmology I**. 1983. New York, 1983. 504p.
- WHITCOMB, R.F.; DAVIS, R.E. Mycoplasmas and phytarboviruses as plant phatogens persistently transmitted by insects. **Annual Review Entomology**. 15:405-464. 1970.
- WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. **Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis**. Ames: Iowa S.Univ. Press. 1994. 173p.
- WOLDEHIWET, Z.; MAMACHE, B.; ROWAN, T. G. Effects of age, environmental temperature and relative humidity on the colonization of the nose and trachea of calves by *Mycoplasma* spp. **British Veterinary Journal**.146: 419–424. 1990.
- YATES, W.D.G.; KINGSCOTE, B.F.; BRANDLEY, J.A.; MITCHELL, D. The relationship of serology and nasal microbiology to pulmonary lesions in feedlot cattle. **Cannadian Journal Compative Medicine**. 47:375-378. 1983.
- YERUHAM, I.; ELAD, D.; LIBERBOLM, M. Clinical and microbiological study of na otitis media outbreak in calves in a dairy herd. **Journal Veterinary Medicine B**. 46:145-150. 1999.

ANEXOS

Anexo A – Coloração de Dienes (Dienes 1945)

- Azul de metileno - 2,5g
- Azur II - 1,25g
- Maltose - 10g
- Carbonato de sódio - 0,25 g
- Ácido benzóico - 0,20g
- Água destilada - quantidade suficiente para 100mL.
- Procedimentos:
- Adicionar os ingredientes, homogeneizando;
- Filtrar o corante antes de usá-lo;

Anexo B- Sensibilidade a digitonina

- Digitonina 15mg
- Etanol 0.1mL
- Dispensar nos discos, 0,25mL/cada
- Secar na estufa a 37°C
- Estocar a 4-10°C
- Aplicar nas placas após semear as colônias suspeitas

Anexo C- Prova de urease

- placas com crescimento de colônias suspeitas de *Ureaplasma*, solução contendo 1% de uréia e 0,8% de cloreto de manganês ($MnCl_2 \cdot 4H_2$). A solução deve ser preparada fresca diariamente ou estocada a -20°C.
- Cortar bloco de Ágar 1cm² de placa com colônias pequenas suspeitas de *Ureaplasma* sp;
- Colocar o bloco Ágar em lâmina com lado das colônias para cima;
- Adicionar 1-2 gotas da solução de $MnCl_2$ no bloco e ler a reação imediatamente no microscópio;
- Colônias de *Ureaplasma* sp. Tornam-se imediatamente marrons. A cor é estável e não se difunde. Se não se tornarem marrons são colônias clássicas de *Mycoplasma* spp. (urease -).

Anexo D- Fermentação de glicose

- PPLO 7mL
- Extrato de levedura 25% 10mL
- Soro eqüino inativado 20mL
- Penicilina 200,000UI/mL 0,5mL
- Vermelho de fenol 1% 0,4mL
- Glicose 50% 1mL
- Meio acima sem glicose dispenso em volumes de 5mL
- Incubar a 37°C 24-48hs

Anexo E – Hidrolise arginina

- PPLO (pH, 7,0) 70mL
- Extrato de levedura 25% 10mL
- Soro eqüino ou suíno 20mL
- L-arginina HCL 10% 5mL
- Penicilina 200,000UI/mL 0,5mL
- Vermelho de fenol 1% 0,4mL
- Preparar igual meio e omitir arginina
- Incubar a 37° por 24-48hs

Anexo F- Meio Hayflick's modificado

- PPLO 23g
- Água destilada 500mL
- pH 7,8
- Autoclavar 120°C 1,5atm 15'

Solução aditiva

- Soro eqüino 200mL
- Penicilina 1000UI/mL
- Extrato levedura 10%
- Glicose 3g
- Vermelho fenol 0,5mL
- Água destilada 500mL
- Para meio sólido adicionar 1,3% ágar

Anexo G – Reagentes utilizados no teste de Imunoperoxidase indireta (IMADA et al.,1987)

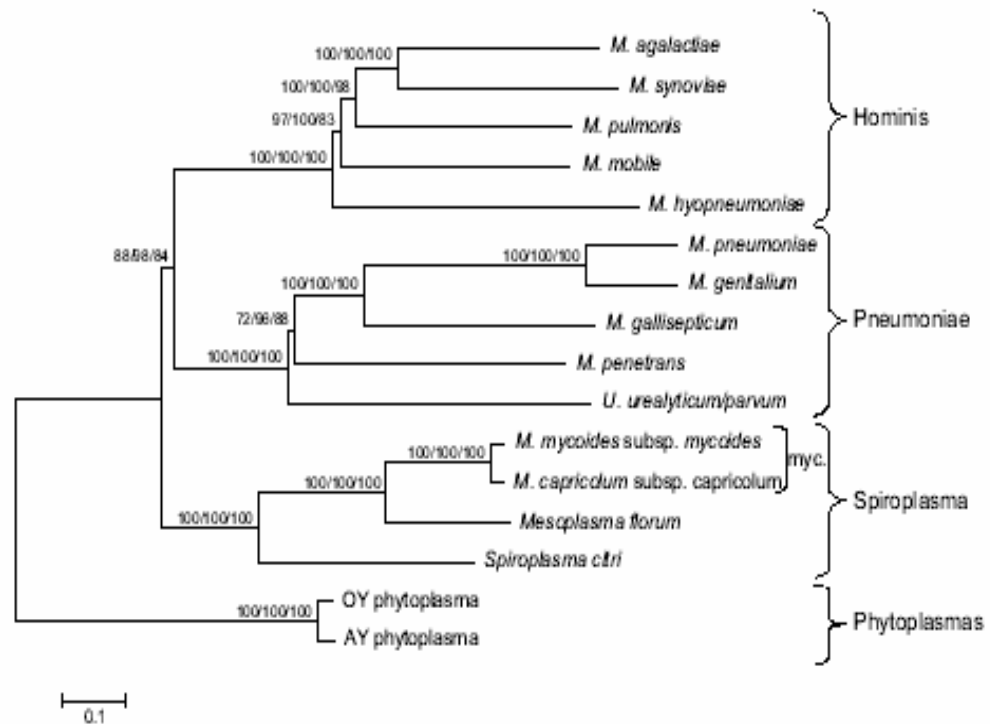
- TBS (Tris Tampão Salina) 0.05M
- NaCl - 2,922g
- Trizma base - 6,057g
- Água destilada - 1000mL
- Ajustar o pH para 7.2-7.4 com HCl
- Tampão de lavagem
- TBS - 100mL
- Soro Eqüino – 2mL
- Tween 20 - 50µl
- Preparo do conjugado
- Conjugado de IgG de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase, diluido a 1:50 em TBS com 1% BSA (TBBS)

- Solução Reveladora
- Sol. A: Metanol gelado - 20mL
- 4-chloro 1- naphthol - 60mg

- Sol. B: TBS - 100mL

- Peróxido de Hidrogênio 30% - 60µl
- Misturar as soluções A e B imediatamente antes do uso.
- A solução “A” pode ser preparada antes do uso e guardada em frasco escuro à -20⁰C.

Anexo H – Árvore filogenética de micoplasmas demonstrando os principais grupos com base no gene 16SrRNA



P. Strand-Pugnet et al. / Research in Microbiology 158 (2007) 754–766

Fig. 1. Phylogenetic tree constructed from the alignment of 91 proteins shared by 16 mollicutes. Briefly, the 91 proteins were identified using the «Multi-proteome differential query» tool implemented in MollGen (<http://cbl.labri.fr/outils/molligen/home.php>), using the bi-directional best hit (BDBH) relationship to identify putative orthologs. Each set of proteins was used to produce an alignment using T-Coffee [34]. The individual alignments were concatenated and phylogenetic trees were constructed using three methods implemented in MEGA 3.1, neighbor joining, parsimony and minimal evolution [25]; 20,912 sites were informative and other conditions were as described elsewhere [48]. Using the three phylogenetic methods in the same order, the bootstrap values indicated on the graph were obtained from 100 replicates. The mycoides cluster of species is indicated (myc.). Scale bar indicates the number of substitution by position.

Anexo I – Quadro com características e classificação taxonômicas de Mollicutes.

TABLE 1. Major characteristics and taxonomy of the class Mollicutes^a

| Classification | Current no. of recognised species | Genome size (kb) | Mol % G+C of genome | Cholesterol requirement | Distinctive properties | Habitat |
|------------------------------|-----------------------------------|------------------|---------------------|-------------------------|--|-------------------------------|
| Order I: Mycoplasmales | | | | | | |
| Family I: Mycoplasmales | | | | | | |
| Genus I: <i>Mycoplasma</i> | 102 | 593–1,350 | 23–40 | Yes | Optimum growth at 37°C | Humans, animals |
| Genus II: <i>Ureaplasma</i> | 6 | 763–1,170 | 27–30 | Yes | Urea hydrolysis | Humans, animals |
| Order II: Enteroplasmales | | | | | | |
| Family I: | | | | | | |
| Enteroplasmaceae | | | | | | |
| Genus I: <i>Enteroplasma</i> | 5 | 793–1,140 | 27–29 | Yes | Optimum growth at 30°C | Insects, plants |
| Genus II: <i>Misoplasma</i> | 12 | 873–1,100 | 27–30 | No | Optimum growth at 30°C; 0.04% Tween 80 required in serum-free medium | Insects, plants |
| Family II: | | | | | | |
| Spiroplasmaceae | | | | | | |
| Genus I: <i>Spiroplasma</i> | 33 | 783–1,220 | 24–31 | Yes | Helical motile filaments; optimum growth at 30–37°C | Insects, plants |
| Order III: Actinopterymales | | | | | | |
| Family I: | | | | | | |
| Actinopterymaceae | | | | | | |
| Genus: <i>Actinopteryma</i> | 13 | 1,503–1,620 | 26–28 | No | Optimum growth at 30–37°C | Animals, some plants, insects |
| Order IV: Anceplasmales | | | | | | |
| Family: Anceplasmaceae | | | | | | |
| Genus I: <i>Anceplasma</i> | 4 | 1,503–1,600 | 29–34 | Yes | Oxygen-sensitive anaerobes | Berlin/bovine furan |
| Genus II: <i>Anceplasma</i> | 1 | 1,500 | 40 | No | Oxygen-sensitive anaerobes | Berlin/bovine furan |
| Undefined taxonomic status | | | | | | |
| Phytoplasma | ND ^b | 640–1,185 | 23–29 | Not known | Uncultured in vitro | Insects, plants |

^a Updated and modified from reference 361.

^b The taxonomic status of the mentioned phytoplasmas is not defined (ND) as yet; two *Caulobacter* (*Phytoplasma*) species have already been published (103, 308).