

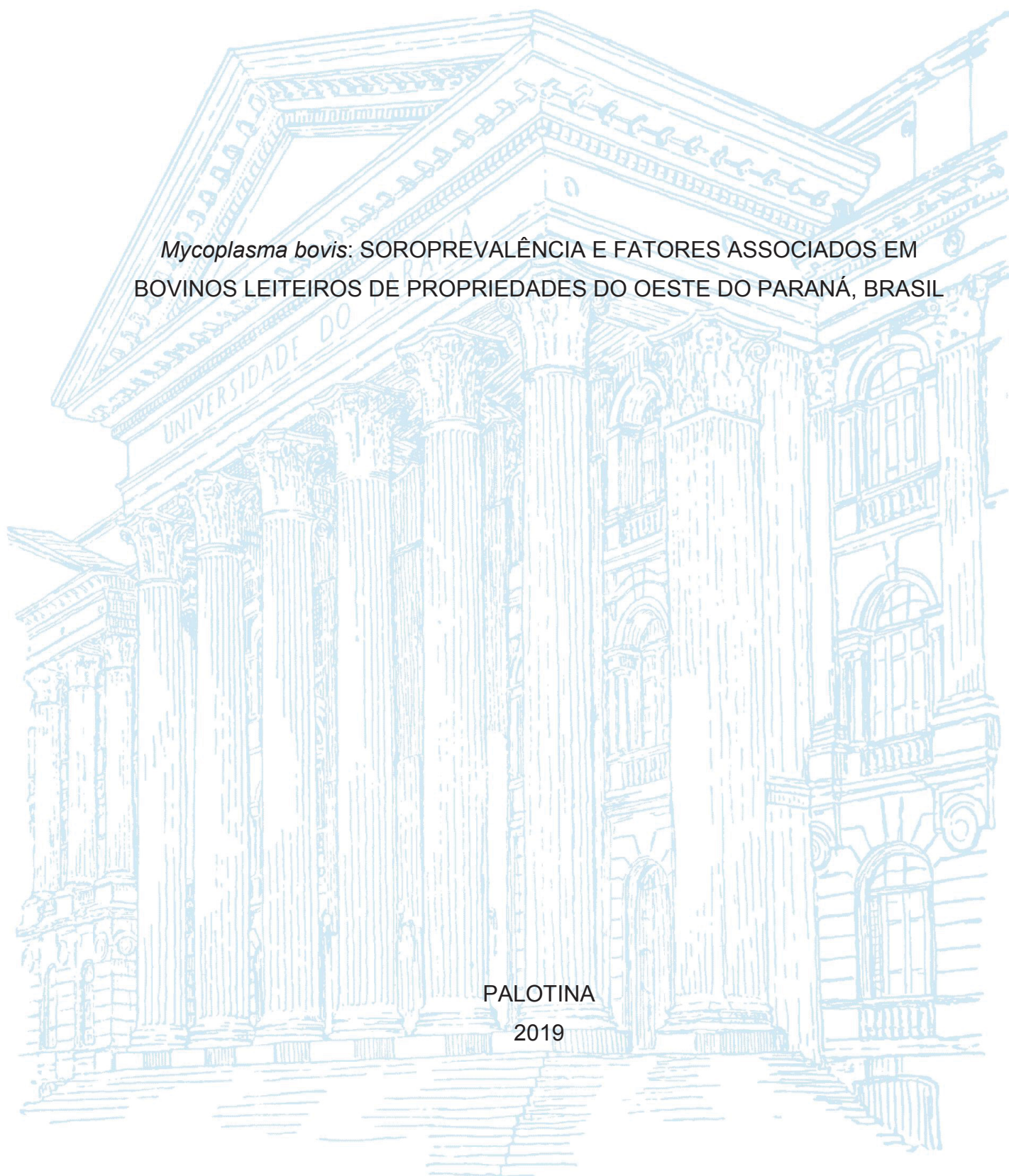
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WELLYTON CARLOS RODRIGUES

Mycoplasma bovis: SOROPREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS EM
BOVINOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ, BRASIL

PALOTINA

2019



WELLYTON CARLOS RODRIGUES

Mycoplasma bovis: SOROPREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS EM
BOVINOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ, BRASIL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Silvia Cristina Osaki

Coorientador: Prof. Dr. Dauton Luiz Zulpo

PALOTINA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R696 Rodrigues, Wellyton Carlos
Mycoplasma Bovis: soroprevalência e fatores associados em
bovinos leiteiros de propriedades do Oeste do Paraná, Brasil /
Wellyton Carlos Rodrigues - Palotina, 2019.
59f.

Orientadora: Silvia Cristina Osaki
Coorientador: Dauton Luiz Zulpo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Anticorpos. 2. Micoplasmose. 3. Bovinocultura leiteira.
I. Osaki, Silvia Cristina. II. Zulpo, Dauton Luiz. III. Universi-
dade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 636.2



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **WELLYTON CARLOS RODRIGUES** intitulada: **Mycoplasma bovis: Soroprevalência e fatores associados em bovinos leiteiros de propriedades do Oeste do Paraná - Brasil**, sob orientação da Profa. Dra. SILVIA CRISTINA OSAKI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 06 de Novembro de 2019.



SILVIA CRISTINA OSAKI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



SHEILA REZLER WOSIACKI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ)



ELISABETE TAKIUCHI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



DAUTON LUIZ ZULLO

Coorientador - Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Ao meu eterno Deus, meus pais Vardelei e Eva, minha
esposa Ellem e minha linda filha Cecília, por estarem sempre comigo
e serem minha base.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus a minha eterna gratidão, pois sem Ele nada teria acontecido. Sem a presença Dele eu não conseguiria enfrentar todas as dificuldades e obter o êxito no meu trabalho.

Agradeço imensamente aos meus pais Vardelei Rodrigues e Eva Maria Santana Rodrigues por todo apoio e incentivo. Desde pequeno tem acompanhado meus sonhos e além de tudo sempre me incentivando a nunca desistir, sempre seguir em frente. Sem vocês eu não teria conseguido, são a minha base, meu exemplo de vida.

Gratidão é a palavra certa para as mulheres mais lindas da Terra, minha esposa Ellem Daize de Oliveira Rodrigues e minha filha Cecília de Oliveira Rodrigues. Vocês são a razão da minha existência, é o que me faz levantar todos os dias pela manhã e enfrentar toda e qualquer dificuldade. Nesse ano de finalização de mestrado ganhei o melhor presente de todos, ser pai. Entre balanços, choros e preenchimento de planilhas estava minha linda filha me fazendo sorrir e acreditar que todo sofrimento valeria a pena, eu amo muito vocês duas.

Minha orientadora Dr^a Silvia Cristina Osaki, muito obrigado por tudo, pela paciência comigo, carinho e por ser tão compreensiva, entendendo minhas dificuldades e limitações, sem você eu não teria conseguido. Obrigado por ser uma excelente profissional e além de tudo uma grande amiga, sou teu fã.

Agradeço aos estagiários do LABIOTEC Ricardo Babinski e principalmente Vinicius Dahm por ter me auxiliado na fase mais complicada do trabalho. Ao meu coorientador Dr. Dauton Luiz Zulpo, por ter aceitado desenvolver o projeto e auxiliar no desenvolvimento do mesmo, tendo sempre paciência e clareza na resolução das dúvidas encontradas durante a escrita do trabalho.

Meus sinceros agradecimentos ao professor Dr Nelson Luís Mello Fernandes por toda a ajuda no laboratório, por doar seu tempo em prol do nosso trabalho.

Agradeço aos meus pastores Jean Carlos Teixeira Nogueira e Cinthia Nogueira por serem meus ajudadores e por estar sempre debaixo de vossas bênçãos, assim agradecendo também a toda membresia da Igreja Evangelica Assembleia de Deus - Missão em Palotina por sempre estar orando por minha vida e de minha família.

Um agradecimento especial também ao Colégio Agrícola Estadual Adroaldo Augusto Colombo, toda equipe pedagógica e direção que estiveram me apoiando durante a fase de desenvolvimento do trabalho. Aos meus alunos que por vezes me ouviram falar sobre o mestrado durante as aulas e em muitas vezes me incentivaram me dando ânimo e coragem para a finalização do projeto.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina por ter aberto as portas e acolhido meu trabalho, tenho orgulho de dizer que sou aluno Federal. Aos animais que são o objetivo principal do nosso estudo, o foco do nosso trabalho, minha vida profissional é dedicada totalmente ao cuidado de vocês.

“Entrega o teu caminho ao SENHOR, confia nele, e o mais ele fará;
Tu, ó Senhor Deus, és tudo o que tenho. O meu futuro está nas tuas
mãos; Tu diriges a minha vida.”
(Salmos 37.5; 16.5)

RESUMO

A bovinocultura tem uma enorme representatividade na economia brasileira, dispondo a atividade leiteira em uma evolução contínua, colocando o Brasil em posição de destaque neste setor em todo o mundo. Vários fatores contribuem para a baixa na produtividade leiteira no país, porém fatores em destaque estão ligados ao manejo reprodutivo, sendo que o *Mycoplasma bovis* está entre os causadores de desordens reprodutivas. Considerando a escassez de dados disponíveis sobre o tema para a região estudada, o objetivo do presente estudo foi detectar a soroprevalência de anticorpos contra o *Mycoplasma bovis* em bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná, Brasil, bem como determinar os fatores associados à infecção. Durante o período de janeiro a julho de 2015 foram visitadas 60 propriedades e coletadas 448 amostras de sangue de bovinos localizadas nas cidades de Cascavel, Toledo, Marechal Candido Rondon e Palotina. Também foi procedido a coleta de informações via questionário epidemiológico e realizada as análises das associações entre soro positividade e as variáveis estudadas pelo programa EpiInfo. Das amostras analisadas, 6,25% (28/448) apresentaram anticorpos contra o *M. bovis*, estas se encontravam distribuídas em 16,67% (10/60) das propriedades. O fator associado à infecção por *M. bovis* foi a faixa etária (8-10 anos). Os resultados demonstram que medidas precisam ser tomadas a fim de realizar o controle e prevenção da infecção por esse agente, visto que o mesmo se encontra circulando nos rebanhos leiteiros das propriedades leiteiras da região Oeste do Paraná.

Palavras-chave: Anticorpos, Micoplasmose, bovinocultura leiteira.

ABSTRACT

Cattle farming has a huge representation in the Brazilian economy, with the dairy industry in a continuous evolution, placing Brazil in a prominent position in this sector worldwide. Several factors contribute to the decrease in milk productivity in the country, but highlighted factors are linked to reproductive management, with *Mycoplasma bovis* being among the causes of reproductive disorders. Considering the scarcity of available data on the subject for the region studied, the objective of the present study was to detect the seroprevalence of antibodies against *Mycoplasma bovis* in dairy cattle in the western region of Paraná, Brazil, as well as to determine the factors associated with the infection. During the period from January to July 2015, 60 properties were visited and 448 blood samples were collected from cattle located in the cities of Cascavel, Toledo, Marechal Cândido Rondon and Palotina. Information was also collected via an epidemiological questionnaire and analyzes of the associations between serum positivity and the variables studied by the EpiInfo program. Of the analyzed samples, 6.25% (28/448) presented antibodies against *M. bovis*, these were distributed in 16.67% (10/60) of the properties. The factor associated with *M. bovis* infection was the age group (8-10 years). The results demonstrate that measures need to be taken in order to control and prevent infection by this agent, since it is found circulating in dairy herds on dairy farms in Western Paraná.

Keywords: Antibodies, Mycoplasmosis, dairy cattle.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Colônias de Mycoplasmas em ágar-ágar.....	19
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- PROPRIEDADES ESTUDADAS QUE MOSTRAM RESULTADOS SOROLÓGICOS POSITIVOS AO <i>Mycoplasma bovis</i> EM BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, BRASIL.....	37
TABELA 2 – FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI- <i>Mycoplasma bovis</i> EM BOVINOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES RURAIS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, BRASIL.....	38
TABELA 3- ASSOCIAÇÃO ESTATÍSTICA COM OS RESULTADOS SOROLÓGICOS POSITIVOS AO <i>Mycoplasma bovis</i> EM BOVINOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES RURAIS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, BRASIL.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

µL	- Microlitro
ADAPAR	- Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
CN	- Controle negativo
CP	- Controle positivo
DEFF	- <i>Design Effect</i>
ELISA	- Ensaio de imunoadsorção enzimática
IA	- Inseminação artificial
IATF	- Inseminação artificial em tempo fixo
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	- Intervalo de Confiança
<i>M. bovis</i>	- <i>Mycoplasma bovis</i>
OR	- Odds Ratio
P	- Probabilidade de significância
PCR	- Reação em Cadeia pela Polimerase
TNF-K	- Fator de necrose tumoral K
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

® - Marca registrada

US\$ - Dólares

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
1 REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 CADEIA PRODUTIVA DE LEITE E SANIDADE ANIMAL	16
1.2 <i>Mycoplasma</i> spp.	17
1.2.1 <i>Mycoplasma bovis</i>	18
1.2.2 Classificação e Estrutura.....	19
1.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos.....	20
1.2.4 Distribuição.....	22
1.2.5 Fatores Associados.....	22
1.2.6 Diagnóstico Laboratorial.....	22
1.2.7 Prevenção e controle	23
1.3. REFERÊNCIAS	24
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 CAPÍTULO 1	29
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1.1 Comissão de Ética no Uso de Animais.....	35
4.1.2 Área de Estudo e Cálculo de Amostragem.....	35
4.1.3 Questionário epidemiológico	35
4.1.4 ELISA Indireto	36
4.1.5 Análise Estatística	36
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.4 CONCLUSÃO	40
4.5 REFERENCIAS CAPITULO 1	41
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE A – MICROPLACA KIT COMERCIAL ID.VET®	54
APÊNDICE B – ADIÇÃO DE SOLUÇÃO DE PARADA PARA INTERRUPÇÃO DA REAÇÃO	55
APÊNDICE C - DESCRIÇÃO DO ELISA INDIRETO	56
APÊNDICE D - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO	56

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores na área da bovinocultura, tendo o seu desenvolvimento tanto na produção de carne quanto de leite. Devido ao seu clima tropical e subtropical, presença de grandes áreas a serem trabalhadas, o Brasil se destaca potencialmente na produção de leite e carne, sendo estas atividades uma grande promessa na exportação tanto de leite, quanto de produtos lácteos (SILVA et al., 2017).

A produção leiteira em alguns locais do país ainda segue sem uma devida padronização, ou seja, há lugares onde existem produções em larga escala, altamente tecnificadas e outras produções estritamente familiares, onde o leite produzido é somente para subsistência, ou existe uma produção pequena, com pouca tecnificação, mão de obra familiar, sendo grande parte das propriedades caracterizadas como familiares de pequena e média produção (ZOCCAL et al., 2008).

Nota-se que essa atividade representa um grande fator produtivo quando comparada às demais atividades realizadas ao longo do país. No entanto mesmo tendo um rebanho de tamanho considerável, a produção leiteira ainda é pequena, ou seja, a quantidade de leite produzida por animal é em volume baixo (IBGE, 2016).

De acordo com dados do IBGE (2016), a região Oeste é a maior produtora do estado, visto que três cidades dessa região estão entre as 15 cidades com maior produção de leite do país (Marechal Cândido Rondon, Cascavel e Toledo). Além disso, no estado ainda há diversos produtores, famílias que obtém sua renda a partir da atividade leiteira, sendo, portanto, de fundamental importância o cuidado nas questões que possam estar afetando essa atividade.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CADEIA PRODUTIVA DE LEITE E SANIDADE ANIMAL

Entre os produtos de maior importância para a agropecuária nacional está o leite, este ocupa melhor posição que outros produtos que têm grande consumo no país como o arroz e o café beneficiado. É um dos alimentos mais completos da natureza, tem alto valor nutritivo, rico em proteínas, gorduras, vitaminas, sais minerais, cálcio e magnésio (PASCHOA, 1997; ALMEIDA et al., 1999; GARCIA et al., 2000; TAMANINI et al., 2007).

A atividade leiteira obteve uma evolução de forma contínua, tendo um excelente crescimento, o que resultou em um posicionamento de destaque do Brasil neste setor em todo o mundo (EMBRAPA, 2018).

De acordo com Chaddad (2007), a cadeia produtiva do leite tem se mostrado um dos setores agroalimentares brasileiros mais dinâmicos. Nas últimas décadas houve várias alterações que incluem maior abertura ao mercado externo, desregulamentação pública do mercado, crescimento do capital estrangeiro, inovações técnicas e organizacionais que provocaram uma grande revolução no setor.

Este é um setor que abre diversas oportunidades, gera renda, empregos, porém também necessita de constante formação e qualificação do produtor e dos profissionais que fazem a assistência técnica.

A produção leiteira é um destaque do agronegócio brasileiro no cenário mundial e seu desempenho produtivo depende da eficácia de diversas medidas profiláticas. Portanto, é necessário que se busque atualizações constantes nas questões que envolvem o controle sanitário, melhorias na produção e qualidade do leite, entre outros (VILELA, 2014; MESQUITA et al., 2015).

Mesmo desempenhando um importante papel na economia do país e do mundo, ainda existem produções que não dispõem de um controle sanitário eficaz de seu rebanho, refletindo em gastos com medicamentos e assistência veterinária, redução da cadeia produtiva e alta morbidade e mortalidade de animais (MESQUITA et al., 2015).

Vários são os fatores que contribuem para a baixa produtividade leiteira no país, dentre eles podem ser citados fatores como genética, mão de obra não

especializada, deficiência no manejo alimentar do rebanho, falhas no controle zootécnico, mau gerenciamento da propriedade, falta de higiene no manejo, falta de assistência técnica especializada, entre outros fatores (SILVA et al., 2017)

Porém um fator que merece destaque nesse cenário são aqueles ligados ao manejo reprodutivo dos bovinos. De Vries (2006) afirma que a incidência de natimortos, abortos, repetição de cio, reabsorção embrionária são fatores que estão diretamente ligados à queda na produção leiteira.

Para que se tenha manutenção da sanidade do rebanho algumas medidas devem ser adotadas e como uma medida profilática há o descarte de bovinos enfermos. Porém, a eliminação de vacas que apresentam algum problema pode estar afetando diretamente a produção, gerando custos elevados ao produtor (SANTOS, 2003).

Dentre as causas de descarte de vacas leiteiras Gronhn et al. (1998) citam a hipocalcemia pós-parto, retenção de envoltórios fetais, deslocamento de abomaso, cetose, metrites, cistos ovarianos e mastite. Além disso, o autor descreve como outros fatores importantes a época de parto, produção leiteira, idade e prenhez.

O micoplasma está entre os causadores de problemas na produtividade. A mastite causada por esse agente é agressiva e muitas vezes refratária ao tratamento. Além da queda de produção do leite, pode ocorrer também um espessamento deste com perda de fluidez, presença de secreção aquosa que pode progredir para um exsudato purulento (MESQUITA et al. 2015).

As espécies mais relatadas são *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma alkalescens*, *Mycoplasma bovigenitalium*, porém a espécie *Mycoplasma bovis* (*M.bovis*) se destaca pela alta casuística e gravidade da doença (WALKER, 2003).

1.2 *Mycoplasma* spp.

Em 1898 ocorreu a primeira identificação de *Mycoplasma* spp., este foi denominado como *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Está associado à pleuropneumonia contagiosa bovina e, subsequentemente, os tipos semelhantes de micoplasmas foram chamados de micro-organismos semelhantes aos da pleuropneumonia (YAMAGUTI , 2009).

Os micoplasmas são bactérias que pertencem à classe dos *Mollicutes*, gênero *Mycoplasma*. São organismos altamente contagiosos, que não possuem parede celular bacteriana típica e com isso os tornam insensíveis aos agentes antimicrobianos contra parede celular, como os β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), das sulfonamidas (por não sintetizarem ácido fólico) e da eritromicina, porém não suportam altas temperaturas e são susceptíveis à ação de desinfetantes e detergentes comuns (ROSENBUSCH, 1994; MAUNSELL et al., 2011).

Considerados os menores micro-organismos de vida livre capazes de autorreplicação, eles são mais dependentes de nutrientes externos, exigindo meios de cultura complexos (METTIFOGO & TAMASO, 2013; MANZI et al., 2018).

A sua susceptibilidade à dessecação, calor, desinfetantes e detergentes se deve ao fato de apresentarem membranas externas flexíveis com a presença de três extratos. Em sua maioria os micoplasmas são anaeróbios facultativos sendo que alguns crescem em condições ótimas numa atmosfera com 5-10% de CO₂ (PRESCOTT et al., 2008).

Mesmo não tendo capacidade de mobilidade, em sua maioria, alguns conseguem deslizar sobre superfícies líquidas. Para o seu crescimento, diferentemente da maioria das bactérias, a maioria das espécies precisam de esteróis para o seu crescimento. Devido à ausência de parede celular, coram como as bactérias Gram negativas com o método de Gram (PRESCOTT et al., 2008).

1.2.1 *Mycoplasma bovis*

A primeira identificação desta espécie no Brasil foi realizada por Rossini em 1978 no Estado de São Paulo. O agente foi encontrado em bezerros acometidos por pneumonia. Em 1982 Liberal et al. identificaram esse micoplasma em casos de pneumonia bovina no estado do Rio de Janeiro (CARDOSO, 2003).

O *M. bovis* é a principal espécie dos micoplasmas causadores de mastite, resultando em um quadro grave da doença. De acordo com Hirsh & Zee (2003) a enfermidade causada por esse agente geralmente está relacionada à glândula mamária, porém devido à bacteremia estabelecida acarreta uma artrite subsequente. Os autores ainda relatam que o *M. bovis* é a espécie mais encontrada nas produções em relação às outras espécies.

Segundo Pfützner & Sachse (1996) o *M. bovis* pode sobreviver a 4 °C quase dois meses em esponjas e no leite e aproximadamente duas semanas na água, mesmo a maioria dos micoplasmas sendo frágeis no ambiente. Em temperaturas superiores, a sobrevivência decresce consideravelmente.

A sobrevivência do *M. bovis* em meio líquido enriquecido é de 59-185 dias, independentemente dos componentes do meio ou da temperatura (NAGATOMO et al., 2001).

1.2.2 Classificação e Estrutura

Os micoplasmas são altamente pleomórficos, ou seja, possuem uma ampla capacidade de variação em sua forma de acordo com o seu período de vida. São capazes de produzir filamentos que parecem fungos, fato que originou o seu nome (*mykes* = fungo e *plasma* = formato) (JUNQUEIRA, 2017).

Os micoplasmas apresentam um crescimento fastidioso e necessitam de meios enriquecidos para se desenvolverem. *M. bovis* cresce numa grande variedade de meios, originando no ágar, em três a cinco dias, colônias com forma de “ovo estrelado” devido ao seu crescimento em profundidade no centro e crescimento superficial na periferia (FIGURA 1) (NICHOLAS & BAKER, 1998; PITCHER & NICHOLAS, 2005).

FIGURA 1: Colônias de *Mycoplasmas* em ágar-ágar



1.2.3 Patogenia e Sinais Clínicos

O micoplasma está associado a diversas doenças, cujos sinais clínicos podem ser na forma aguda, porém normalmente são de caráter crônico (ROSENBUSCH, 1994). Algumas espécies possuem tropismo por determinadas regiões anatômicas, enquanto outros podem ser encontrados em várias localizações. De acordo com Kirkbride (1987) e Stipkovits et al. (1993) essas bactérias são potenciais causadores de doenças no sistema respiratório, urogenital, glândulas mamárias, articulações, sistema nervoso e conjuntiva ocular.

Podem causar diversas enfermidades em animais de produção, quando relacionada à espécie bovina, como pneumonia em bezerros, poliartrite e mastites em vacas lactantes. Também pode estar associado a casos de endometrites, salpingites, otites, meningites, abortamentos e vesiculite seminal (JUNQUEIRA, 2017; NICHOLAS & AYLING, 2003).

Para a produção leiteira esse patógeno traz grandes prejuízos quando relacionado à mastite causada por ele. Entre os sinais clínicos apresentados pelo animal estão agalaxia em mais de um quarto mamário, dificuldade quanto à resposta ao tratamento realizado, claudicação, edema de membros anteriores, emagrecimento progressivo e alguns animais podem apresentar mastite em quadro grave, mas aparentam estar saudáveis. Além desses sinais, segundo Pretto et al., (2001), o leite apresenta um sedimento semelhante à areia.

Mesquita et al. (2015) relata que este patógeno é um grande causador de ooforites, salpingites e abortos em caráter experimental, porém não são comumente isolados no trato urogenital dos bovinos. Este micro-organismo é isolado ocasionalmente de fetos bovinos abortados e semiovoculites, porém é um importante agente causador de artrite, pneumonia e mastite (JASPER, 1994).

Por ser contagioso, pode se disseminar rapidamente entre as vacas de um rebanho. A maioria das novas infecções intramamárias é transmitida a partir de fômites, como as mãos dos ordenhadores, equipamento de ordenha e o uso de cânulas de uso múltiplo para tratamento (MANZI, 2014).

As vias de transmissão desse micro-organismo são aparentemente simples e se dão pelo contato direto e possivelmente, transmissão por via congênita (PFÜTZNER & SACHSE, 1996).

Os fatores que representam maiores perdas econômicas nas propriedades pela presença de micoplasmas são a diminuição do número de gestações, ocorrência de perdas fetais, ou também a ocorrência de partos prematuros. A partir disso ocorre diminuição do número de serviços por animal, perdas na qualidade do sêmen, aumento dos custos com assistência veterinária e gastos com medicações para o tratamento das infecções (CARDOSO, 2004).

As vacas também podem ser consideradas fontes de infecção, pois podem estar juntas ao plantel sendo portadoras do agente. Esses animais acabam transmitindo a doença a animais sadios de maneira intermitente, sendo o leite uma via de grande importância, pois os bezerros alimentados com o leite mamítico decorrente da infecção por micoplasma vão acabar contraindo a doença.

Jasper (1994) afirma que o *M. bovis* pode ser carregado no trato respiratório de animais assintomáticos, possivelmente servindo como uma fonte para infecções mamárias, os bezerros que se alimentam de leite contaminado podem se tornar portadores do micro-organismo no trato respiratório, podendo resultar em pneumonia.

Vacas com mastite causada por micoplasma geralmente desenvolvem infecções múltiplas nos quartos, podendo apresentar todos os quartos infectados. As infecções, em sua maioria, irão acontecer por meio do leite contaminado, a transmissão da mastite entre quartos de uma mesma vaca pode ocorrer via corrente sanguínea.

De acordo com Walker (2003) esses micro-organismos possuem a capacidade de expressar forte aderência à superfície celular, o que facilita sua sobrevivência e patogenicidade, evitando que sejam totalmente eliminados por secreções fisiológicas.

Gourlay, Thomas & Wyld (1989); Pfützner & Sachs (1990); Nicholas & Ayling (2003) relatam em seus trabalhos que a introdução da infecção em rebanhos livres de *M. bovis* se dá por meio de vitelos clinicamente sãos ou bovinos jovens que disseminam o agente, sendo que após ser estabelecida a infecção, a erradicação torna-se quase impossível. Em explorações com baixa incidência de doença respiratória a sua introdução pode causar aumento da morbidade e da mortalidade. Os animais atuam como reservatório da infecção, excretando o agente através do trato respiratório durante vários meses ou anos.

1.2.4 Distribuição

O *Mycoplasma bovis* está presente em rebanhos do mundo inteiro inclusive do Brasil. Este agente, por ser contagioso, pode se disseminar rapidamente entre as vacas de um rebanho.

Mettifogo & Tamaso (2013) descrevem que, na União Europeia não há restrições oficiais à circulação de animais positivos. Porém, há uma maior consciência por parte de alguns países importadores sobre os riscos na aquisição de animais infectados, solicitando então que se façam testes e que demonstre que estes animais estejam livres de *Mycoplasma bovis*. No Brasil, poucos surtos foram relatados até o momento, em parte pelo desconhecimento da doença, outra pelas dificuldades na confirmação do diagnóstico.

1.2.5 Fatores Associados

O agente, na maioria das vezes, entra no rebanho livre a partir da introdução de novos animais, aparentemente saudáveis, porém portadores deste micro-organismo. Esse tipo de manejo é um importante fator de risco. O agente também pode ser transmitido para o rebanho através da ordenha de animais contaminados juntamente com animais saudáveis, mãos do ordenhador e equipamentos de ordenha. Outros fatores de risco incluem o contato entre animais e a inseminação artificial (JUNQUEIRA, 2017).

1.2.6 Diagnóstico Laboratorial

A bactéria *M. bovis* necessita de meios e condições especiais para o seu desenvolvimento, dificultando o diagnóstico. Este pode ser realizado utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com uso de *primers* específicos e também PCR em tempo real. Além dessa forma de diagnóstico pode ser realizado o teste de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto e imunofluorescência (MANZI, 2014).

Cardoso (2004) cita em seu trabalho que o isolamento é o método de escolha para detecção do agente, visto que essa técnica possibilita a visualização dos micro-organismos. Porém dependendo do material a ser coletado e o tipo de

manejo realizado, essa amostra poderá ser afetada com a presença de bactérias consideradas oportunistas.

Outros fatores mencionados por Cardoso (2004) são decorrentes do tempo entre a coleta do material e o seu processamento laboratorial, pois isso poderá estar afetando a viabilidade do agente que se busca. Com isso há uma procura por técnicas mais rápidas, sensíveis e específicas de diagnóstico.

1.2.7 Prevenção e controle

Há relatos que cepas de *M. bovis* na Europa já se tornaram resistentes aos antimicrobianos tradicionalmente usados para o tratamento de infecções causadas por micoplasmas, como oxitetraciclinas, tilmicosina e espectinomicina (AYLING et al., 2000). As drogas indicadas são aquelas que agem na síntese proteica e no DNA dos micoplasmas.

As cepas apresentam variações antigênicas de superfície que os ajudam a escapar do sistema imunológico do hospedeiro (METTIFOGO & TAMASO, 2013). Com isso se tem-se dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina que possa proteger os rebanhos contra as cepas variantes.

Quando se fala em problemas mamários, não existe um tratamento eficaz para a mastite causada por *M. bovis*. Para o controle da mastite adota-se as medidas higiênico-sanitárias tais como higiene da ordenha, imersão dos tetos em solução antisséptica, limpeza e manutenção dos equipamentos de ordenha.

Heller et al. (1993) e Filioussis et al. (2007) descrevem que para o controle da doença deve ser realizada a identificação das vacas infectadas e subsequente segregação destas. Quando a micoplasmose é detectada no leite é recomendável que se faça o descarte do animal que foi acometido, ou, se fazer o isolamento do mesmo para que assim possa evitar a disseminação do agente para os demais animais (NICHOLAS et al., 2016).

De acordo com o trabalho realizado por Pretto et al. (2001) para que obtivesse sucesso no controle das mastites por micoplasma realizou-se a alteração na sequência da ordenha, monitoramento bacteriológico, realização periódica do CMT, antibioticoterapia e após identificação dos animais positivos os mesmos foram descartados. Também manejos de higiene foram utilizados tais como antissépticos e

desinfetantes e também realizada a manutenção e revisão regular do equipamento de ordenha.

1.3. REFERÊNCIAS

BRASIL. Abate de animais, produção de leite, couro e ovos. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 de setembro de 2019.

CARDOSO, M.V. ***Mycoplasma bovis, M.bovigenitalium e Ureaplasma Diversum em Touros. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico.*** Tese(Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. 2003.

CARDOSO, M.V.; VASCONCELLOS, S.A. (2004). Importância Das Micoplasmoses Na Fertilidade De Touros. **Arquivos Do Instituto Biológico**. 71.257-265.

CHADDAD, F. Cooperativas no agronegócio do leite: mudanças organizacionais e estratégicas em resposta à globalização. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v. 9, p. 69-78, 2007.

DE MESQUITA, S. M. C.; MANSUR, F. J.; DO NASCIMENTO, E. R.; BARRETO, M. L.; KIMURA, L. M. S. Padronização e aplicação de ELISA indireto para diagnóstico de *Mycoplasma bovis* em amostras de soro sanguíneo bovino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, n. 2, p. 101-107, 28 jun. 2015.

GOURLAY, R. N.; THOMAS, L. H.; WYLD, S. G. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. **Veterinary Record**, v. 124, p. 420-422, 1989.

IBGE. Banco de dados Agregados. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 16 de agosto de 2019.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal, 2015. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br.htm>>. Acesso em: 04 de agosto de 2019.

JUNQUEIRA, N. B. ***Mycoplasma bovis como agente causal de mastite clínica bovina.*** Botucatu, 2017. 38p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

LACERDA, E.C.Q. **Efeito de inclusão de orégano na dieta de vacas leiteiras sobre a qualidade do leite.** Dissertação do Programa de Pós-Graduação “*Strictu Senso*” do Curso de Especialização em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2012.

MANZI, M.P. **Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras do interior do estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014.

MESQUITA, S.M.C. et al. Padronização e aplicação de ELISA indireto para diagnóstico de *Mycoplasma bovis* em amostras de soro sanguíneo bovino. **Rev. Bras. Med. Vet.**, 37(2):101-107, abr/jun 2015.

METTIFOGO, E. & TAMASO, E. (2013). **Mastite por *Mycoplasma bovis*: surtos em Minas Gerais levam ao descarte de animais produtivos**.

NAGATOMO, H. et al. Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. **Veterinary Microbiology**, 82, 223-232. 2001.

NICHOLAS, R. & AYLING, R.(2003). *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. **Research in veterinary science**. 74. 105-12. 10.1016/S0034-5288(02)00155-8.

Nicholas, R. A. J. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. **Veterinary Record**, 168: 459-462. 2011

PFÜTZNER, H. & SACHSE, K. (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle.. **Rev Sci Tech.**, 15(4), 1477-94.

PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P. & KLEIN, D.A. (2008). **Microbiology** (7th edition). New York: McGraw-Hill.

PRETTO, L.G.et al. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras.** [online]. 2001, vol.21, n.4, pp.143-145. ISSN 0100-736X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2001000400003>.

RAPOSO, J.M.C.R. **Prevalência de *Mycoplasma bovis* em 3 OPP Portuguesas: estudo sero-epidemiológico**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária), Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2009.

ROSENBUSCH R. F. **Biology and taxonomy of the Mycoplasmas**. In: Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH, editors. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames (IA): Iowa State University Press; 1994. p. 3–11.

SALINA,A. **Avaliação microbiológica e molecular de isolados de *Mycoplasma spp.* A partir do leite de mastite clinica bovina**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2018.

SANTOS, J.P.V.A. **Índices zootécnicos e impactos nos custos da reposição**. Disponível em: <http://www.milkpoint.om.br/mn/radarestecnicos/artigo.html>. Acesso em: 14 de setembro de 2019.

SILVA, A. M. ET AL. Conjuntura da pecuária leiteira no Brasil. **Nutritime revista eletrônica**, On-line. Viçosa, v.14, n.1, p.4954-4958, jan./ fev. 2017. Issn: 1983-9006. Acesso em: 23 de setembro de 2019.

SNAK, A. **Prevalência e fatores de risco associados a infecção por *Neospora caninum* e *Trypanossoma vivax* em bovinos leiteiros e ocorrência de *n. caninum* e parasitos gastrointestinais em cães de propriedades rurais do Oeste do Paraná, Brasil.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Palotina, 2017.

VILELA, D.;RESENDE, J. C. de. **Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década.** In: Simpósio Sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Seminário dos Centros Mesorregionais de Excelência em Tecnologia do Leite - Maringá. Universidade Estadual de Maringá, 2014

YAMAGUTI M. **Isolamento de micoplasma de suínos com problemas respiratórios e tipificação dos isolados pela PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA.** Tese (doutorado), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo- SP, 2009.

ZOCCAL, R. O leite no Brasil. In: **ANUÁRIO brasileiro do leite.** Passo Fundo: O Nacional, 2008.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil ocupa um lugar privilegiado no potencial produtivo quando relacionado à bovinocultura leiteira. As perspectivas de produção e mercado nessa área são grandes, visando sempre a manutenção do país em posição de destaque no ramo da produção leiteira (VILELA & RESENDE, 2014).

Devido ao fato de muitos produtores dependerem desse tipo de produção para obtenção de renda e manutenção de suas famílias, quanto mais pesquisas relacionadas à melhora do desempenho produtivo e sucesso da produção, mais satisfatória e rentável será essa atividade.

A escassez de dados referentes a esse agente causando problemas na bovinocultura é muito grande. A falta de informação por parte dos produtores quanto à gravidade da permanência do micoplasma em seu rebanho ainda tem um grande impacto na produção.

Além disso, no Brasil, existem poucos estudos sobre doenças, como por exemplo, mastite bovina causada por *Mycoplasma* spp. e a pesquisa dessas enfermidades estão restritas a levantamentos e identificação de surtos esporádicos, sendo possível sugerir que estas infecções estejam subnotificadas (MESQUITA et al., 2015).

São poucos os laboratórios que incluem na sua rotina de trabalho a análise que busca diagnosticar esse agente. Como este patógeno possui alta transmissibilidade fazem-se necessárias investigações nos rebanhos no país, para se evitar a transmissão e prejuízos em rebanhos leiteiros, uma vez que não há tratamento eficaz para o seu controle.

Devido a esses fatores torna-se necessário o conhecimento deste tão importante agente, bem como de sua prevalência, principalmente na região de estudo, sendo dados que servirão como base para novas pesquisas, conhecimento por parte de técnicos e produtores e desenvolvimento de alternativas que possam estar diminuindo a ocorrência de problemas relacionados ao micoplasma nos rebanhos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar uma soroprevalência de *Mycoplasma bovis* em bovinos leiteiros de municípios da região Oeste do Estado do Paraná, Brasil, bem como determinar os fatores associados à infecção por este patógeno.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a soroprevalência de *Mycoplasma bovis* em bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná, Brasil;

Verificar a presença de fatores associados à infecção;

Contribuir na redução da prevalência a partir dos conhecimentos dos fatores associados encontrados;

4 CAPÍTULO 1

Artigo intitulado: *Mycoplasma bovis*: SOROPREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS EM BOVINOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES DO OESTE DO PARANÁ, BRASIL.

***Mycoplasma bovis*: Soroprevalência e fatores associados em bovinos leiteiros de propriedades do Oeste do Paraná, Brasil**

Wellyton Carlos Rodrigues, Vinicius Dahm, Dauton Luiz Zulpo, Nelson Luís Mello Fernandes, Alessandra Snak, Silvia Cristina Osaki

RESUMO

O *Mycoplasma bovis* é um agente infeccioso que pode ser a causa de doenças como artrite, mastite, pneumonia e desordens reprodutivas. O aumento do intervalo entre partos, repetição de estro e doenças na glândula mamária são as principais alterações clínicas em bovinos e tendem a interferir na produtividade, trazendo prejuízos econômicos aos produtores. Considerando a escassez de dados disponíveis sobre o tema para a região estudada, o objetivo do presente estudo foi determinar soroprevalência de anticorpos contra o *Mycoplasma bovis* em bovinos leiteiros da região Oeste do Paraná, Brasil, bem como determinar os fatores associados à infecção. Durante o período de janeiro a julho de 2015 foram visitadas 60 propriedades e coletadas 448 amostras de sangue de bovinos localizadas nas cidades de Cascavel, Toledo, Marechal Candido Rondon e Palotina. Também foi procedido a coleta de informações via questionário epidemiológico e realizada as análises das associações entre soro positividade e as variáveis estudadas pelo programa EpiInfo. Das amostras analisadas, 6,25% (28/448) apresentaram anticorpos contra o *M. bovis*, estes se encontravam distribuídas em 16,67% (10/60) das propriedades. O fator associado à infecção por *M. bovis* foi a faixa etária (8-10 anos). Os resultados demonstram que medidas precisam ser tomadas a fim de realizar o controle e prevenção da infecção por esse agente, visto que o mesmo se encontra circulando nos rebanhos leiteiros das propriedades leiteiras da região Oeste do Paraná.

Palavras-chave: Anticorpos, Micoplasmose, bovinocultura leiteira.

ABSTRACT

Mycoplasma bovis is an infectious agent that can be the cause of diseases such as arthritis, mastitis, pneumonia and reproductive disorders. The increase in the interval between births, recurrence of estrus and diseases in the mammary gland are the main clinical changes in cattle and tend to interfere in productivity, bringing economic losses to producers. Considering the scarcity of available data on the subject for the region studied, the objective of the present study was to determine seroprevalence of antibodies against *Mycoplasma bovis* in dairy cattle in the western region of Paraná, Brazil, as well as to determine the factors associated with the infection. During the period from January to July 2015, 60 properties were visited and 448 blood samples were collected from cattle located in the cities of Cascavel, Toledo, Marechal Cândido Rondon and Palotina. Information was also collected via an epidemiological questionnaire and analyzes of the associations between serum positivity and the variables studied by the EpiInfo program. Of the analyzed samples, 6.25% (28/448) presented antibodies against *M. bovis*, these were distributed in 16.67% (10/60) of the properties. The factor associated with *M. bovis* infection was the age group (8-10 years). The results demonstrate that measures need to be taken in order to control and prevent infection by this agent, since it is circulating in the dairy herds on dairy farms in Western Paraná.

Keywords: Antibodies, Mycoplasmosis, dairy cattle.

INTRODUÇÃO

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) é um importante patógeno dos bovinos e está associado a mastites, doenças do sistema respiratório, artrite, otite e ceratoconjuntivite (NICHOLAS & AYLING, 2003). Este agente faz parte da classe do *Mollicutes*, sendo uma classe específica de bactérias pequenas, pleomórficas e não possuem parede celular (HERMANN, 1992). Apesar da fragilidade da maioria dos micoplasmas no ambiente, *M. bovis* pode sobreviver de semanas a meses em água, leite e material de lavagem de utensílios leiteiros (PFUTZNER & SACHSE, 1996). Entretanto, é improvável que o ambiente forneça uma importante fonte de infecção quando comparado a animais infectados em uma produção leiteira (NICHOLAS & AYLING, 2003).

O primeiro isolamento do *M. bovis* ocorreu nos Estados Unidos da América em 1961, depois de ter causado um surto grave de mastite que acometeu mais de 30% do rebanho. No Brasil a identificação ocorreu pela primeira vez em 1978 em bezerros no Estado de São Paulo. Logo depois, no Estado do Rio de Janeiro, Liberal et al. (1982) relataram o isolamento desse agente.

Atualmente, entre os micoplasmas, o *M. bovis* é uma das espécies que representa maior importância na infecção de bovinos e geralmente está associada à ocorrência de doenças nesses animais (PARKER et al., 2018).

A importância da infecção por *M. bovis* aumentou na última década devido ao crescente número de surtos nos principais países produtores de leite (Estados Unidos, Índia, China e Brasil) (VAHANIKKILAA et al., 2019). A transmissão ocorre em sua maioria por meio de contato direto, sendo que secreções leiteiras, aerossóis de secreções respiratórias e a transmissão venérea desempenham um importante papel na disseminação do agente no rebanho. Stone et al. (1969) descreveram a possibilidade de ocorrer a transmissão placentária, posteriormente Kapoor et al. (1989); Trichard; Jacobsz (1985) isolaram o *Mycoplasma* spp em fetos abortados e anexos fetais.

Há muitas espécies de micoplasmas, porém poucas são relacionadas aos casos de mastite. Quando se trata de *M. bovis*, este é considerado o mais frequente e patogênico, os casos podem chegar a 50% de positividade para esse agente (WEN et al., 2019). O agente pode causar mastite clínica, afetando geralmente todos

os quartos mamários e se caracteriza por aumento dos casos clínicos que não respondem ao tratamento (PARKER et al., 2018).

A infecção ocasiona uma queda de produção do leite, espessamento deste com perda de fluidez, secreção aquosa que pode progredir para um exsudato purulento (MESQUITA et al., 2015). As alterações causadas são visíveis como, sobrenadante líquido com mudança na coloração, podendo ir de amarelo a marrom com presença de grumos (PRETTO et al., 2001).

Diante da importância deste patógeno a detecção de bovinos infectados, especialmente animais com a infecção subclínica, é de suma importância na prevenção da introdução do agente em rebanhos livres da bactéria ou na prevenção de surtos (CASWELL & ARCHAMBAULT, 2007). Para esse diagnóstico considera-se como método confiável a detecção de anticorpos contra o *M. bovis*. Para isso o ELISA indireto é considerado um excelente teste de diagnóstico, visto que os níveis de anticorpos permanecem elevados por muitos meses após a infecção (MESQUITA et al., 2015).

Em relação a vacinação contra o *M. bovis*, nos Estados Unidos ainda não foi possível obter uma vacina eficaz para auxílio no controle das enfermidades causadas por esse agente (MAUNSEALL et al., 2009). Na Inglaterra há produção de vacinas inativadas contra pneumonia, sendo que esta tem mostrado resultados satisfatórios quando relacionada à mortalidade de bezerras e também na diminuição dos gastos com o tratamento dos animais (NICHOLAS ET AL., 2002; NICHOLAS, 2011). No Brasil a vacinação ainda demonstra poucos resultados, portanto a melhor forma de realizar a prevenção ainda é a separação adequada dos animais e medidas sanitárias eficazes (NICHOLAS; AYLING, 2003).

A alta transmissibilidade do agente, ineficácia no seu tratamento, perdas reprodutivas e prejuízos causados aos produtores são de extrema relevância, sendo assim relevante os estudos epidemiológicos sobre a bactéria. Também se faz necessário conhecer os fatores de risco que estão presentes na disseminação do agente etiológico, assim podendo desenvolver técnicas de manejo a fim de evitar a propagação da enfermidade.

Diante da importância que este patógeno representa para a produção leiteira, visto à dificuldade em seu diagnóstico, grande disseminação nos rebanhos e importantes manifestações clínicas no animal, o trabalho tem por objetivo obter dados de soroprevalência de *Mycoplasma bovis* em bovinos leiteiros de municípios

da região oeste do Paraná, Brasil, bem como determinar os fatores associados à infecção por este patógeno.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Comissão de Ética no Uso de Animais

Esse estudo está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná-Setor Palotina, com protocolo número 50/2014.

4.1.2 Área de Estudo e Cálculo de Amostragem

O número de propriedades foi obtido junto à Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR) (SNAK, 2017). As propriedades, em cada cidade, foram selecionadas e a partir da concordância dos produtores foram coletadas as amostras, abrangendo desde a pequena produção até a produção em grande escala.

Durante o período de janeiro a julho de 2015 foram visitadas 60 propriedades e coletadas 448 amostras de sangue de fêmeas bovinas (SNAK, 2017). Do sangue colhido por meio de venopunção caudal, após procedimento de centrifugação no Laboratório de Biotecnologia da UFPR-Palotina, obteve-se o soro de todos os animais. O soro foi mantido em microtubos e permaneceu armazenado e congelado até a realização da prova sorológica.

A amostragem foi obtida através do programa Epilnfo (versão 7.2.0.1), onde foi utilizado uma prevalência esperada de 17,2% (TIMONEN et al., 2017), erro máximo esperado de 5%, intervalo de confiança de 95% e DEFF (*Design Effect*) 1,5, que deve ser utilizado quando não há coleta de amostras aleatoriamente, diminuindo o erro; tendo como resultado 328 amostras como número mínimo a ser coletado. Contudo, foi utilizado um número de 448 animais, distribuídos em quatro cidades da Região Oeste do Paraná: Cascavel, Marechal Cândido Rondon, Palotina e Toledo.

4.1.3 Questionário epidemiológico

Os fatores associados ao *M. bovis* foram analisados por meio de um questionário epidemiológico previamente aplicado aos produtores no momento da visita para a coleta das amostras. As informações foram obtidas com base na descrição realizada pelo entrevistado e do banco de dados da propriedade.

Foram avaliadas variáveis ambientais (presença de cães, contato de cães com os bovinos, idade do rebanho, raça dos bovinos, tipo de produção), sanitárias e reprodutivas (casos de abortos, histórico de aborto) e produtiva (tipo de produção).

4.1.4 ELISA Indireto

O método sorológico utilizado foi o ELISA indireto, utilizando o *kit* comercial ID.vet® de acordo com as recomendações do fabricante.

4.1.5 Análise Estatística

A análise estatística e a correlação dos dados do questionário epidemiológico com os fatores associados foram realizadas utilizando o software EpiInfo (versão 7.2.0.1), através do qui-quadrado tabelado na ordem 2x2 e correção de Yates.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A soroprevalência de *M. bovis* detectada para os bovinos do presente estudo foi de 6,25% (28/448). Em relação às propriedades 16,67% (10/60) apresentaram ao menos um bovino positivo (Tabela 1), sendo que entre as cidades onde foi realizado o estudo, Palotina não obteve nenhuma propriedade positiva (0/6), em Toledo a prevalência foi de 5,26% (1/19), em Marechal Cândido Rondon 17,64% (3/17), e Cascavel 33,33% (6/18), representando a maior prevalência (Tabela 2).

TABELA 1- PROPRIEDADES ESTUDADAS QUE MOSTRAM RESULTADOS SOROLÓGICOS POSITIVOS AO *Mycoplasma bovis* EM BOVINOS LEITEIROS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, BRASIL.

Número da propriedade	Negativo	Positivo	Total
1	7	1	8
19	9	1	10
25	6	1	7
29	0	7	7
30	6	3	9
31	0	10	10
32	9	1	10
47	2	2	4
49	5	1	6
60	4	1	5

São poucos os estudos que demonstram a prevalência desse agente nas produções leiteiras brasileiras. O resultado da prevalência do presente trabalho corrobora com os dados apresentados por Mesquita et al. (2015) que obtiveram prevalência de 3,1% nas amostras dos animais e 46,7% entre as respectivas fazendas estudadas. Em um estudo realizado por Pretto et al. (2001), utilizado a técnica de isolamento em ágar de Hayflick modificado para avaliação de rebanhos acometidos por mastite, demonstraram que o *M. bovis* estava presente em 5,83% das amostras dos bovinos, sendo que quando analisadas as propriedades, 100% foram positivas.

TABELA 2- FREQUÊNCIA DE ANTICORPOS ANTI-*Mycoplasma bovis* EM BOVINOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES RURAIS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, BRASIL.

Cidade	<i>Mycoplasma bovis</i>			
	Animais Reagentes	%	Propriedades Reagentes	%
Cascavel	22/149	14,8	6/18	33,33
Marechal Candido Rondon	4/111	3,6	3/17	17,64
Palotina	0/45	0	0/6	0,00
Toledo	2/143	1,4	1/19	5,26
TOTAL	28/448	6,25	10/60	16,67

Giroto et al. (2012) relataram uma prevalência, por meio de PCR, de 60,97% em bovinos localizados no Estado do Paraná, na região de Londrina. Uma alta prevalência também foi descrita por Witter et al. (2017), utilizando a técnica PCR, onde 64,2% dos bovinos estudados em Ji-Paraná, Rondônia, mostraram-se positivos para micoplasma. Holsbach (2017) identificou, por meio da PCR, a prevalência de micoplasmas no rebanho de 12 - 17,8% e sendo que nas propriedades o agente foi responsável pela ocorrência em 41,5 - 51%. Estes resultados estão de acordo com o encontrado no presente estudo, sugerindo que mesmo obtendo uma prevalência baixa nos animais, há um potencial de disseminação nas propriedades.

Prevalências semelhantes foram descritas por Al-Farha et al. (2017) no sul da Austrália(6,2%), Filioussis et al. (2007) no norte da Grécia (8,2%), Karahan et al. (2010) no leste da Turquia (valores maiores que 21,1%). Arcangioli et al. (2011) atribuíram essa variação na prevalência a fatores como tamanho do rebanho e práticas de manejo adotadas pela propriedades.

Os fatores associados ao risco da infecção por *M. bovis* em bovinos leiteiros na região Oeste do Paraná foram avaliados e somente a faixa etária de 8 a 10 anos representou valores significativos para essa associação (Tabela 3).

TABELA 3- ASSOCIAÇÃO ESTATÍSTICA COM OS RESULTADOS SOROLÓGICOS POSITIVOS AO *Mycoplasma bovis* EM BOVINOS LEITEIROS DE PROPRIEDADES RURAIS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ, BRASIL.

Variável	Total	Positivo (%)	OR	IC 95%	P
Idade 8-10 anos					
Sim	5	18,52	3,93	1,36-11,33	0,02
Não	23	5,42			

OR: Odds Ratio; IC: intervalo de confiança; P: probabilidade de significância

No presente estudo foi observado como fator associado ao risco, a idade dos animais, especificamente entre 8 a 10 anos. Nossos resultados estão de acordo com os dados obtidos no estudo Al-Momani et al. (2008) que citam que na Jordânia os principais fatores de risco foram associados com os animais mais velhos ou aqueles que estavam em lactação.

Tagawa et al. (2008) e Giroto et al. (2012) detectaram uma alta prevalência em bovinos leiteiros com mais de 2 anos de idade, sendo relatado que animais com 1 a 3 anos de idade são mais suscetíveis à infecção por hemoplasmas bovinos. Contudo Sickles; Kruze & Gonzalez (2000) afirmam que o gado leiteiro pode ser portadores assintomáticos de micoplasmas e várias espécies desses micro-organismos fazem parte da microbiota do trato respiratório e urogenital desses animais e isso não depende da idade, portanto a doença pode acometer os animais independente se são animais jovens ou animais velhos.

Cardoso (2003) atribui o maior risco a vacas mais velhas de ter a infecção pelo *M. bovis* pelo fato de estarem expostas ao agente por um período maior de tempo. Este autor também atribui o risco às novilhas e vacas mais novas pelo fato do seu sistema imunológico estar imaturo. Smith et al. (1990) afirmaram que por permanecerem mais tempo no rebanho as fêmeas acabam se tornando mais susceptíveis a infecção e, conseqüentemente, acabam adquirindo a doença.

4.4 CONCLUSÃO

O *Mycoplasma bovis* foi detectado, desta forma sugere-se então que este é um agente circulante nos rebanhos bovinos das propriedades leiteiras da Região Oeste do Paraná avaliadas neste experimento. O principal fator de risco evidenciado no estudo está relacionado com a faixa etária (8-10 anos).

Com esses resultados tem-se um conhecimento maior sobre a associação da região quando relacionada a presença do agente, esses dados tem uma representatividade muito importante, pois através deles medidas podem ser tomadas a fim de evitar a disseminação do *M. bovis* nas demais propriedades da região.

Através deste estudo produtores e profissionais irão obter uma base para conhecimento sobre a circulação do agente nestas localidades, podendo assim oferecer condições que melhorem a saúde de seus rebanhos.

4.5 REFERENCIAS CAPITULO 1

AL-FARHA, A., HEMMATZADEH, F., KHAZANDI, M., HOARE, A., AND PETROVSKI, K. (2017). Evaluation of effects of *Mycoplasma mastitis* on milk composition in dairy cattle from South Australia. **BMC Veterinary Research**, 13: 351.

AL-MOMANI, W.; NICHOLAS, R.A.J.; ABO-SHEHADA, M.N. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam. n.83, p.1–10, 2008.

ANTONIASSI, N. A. B.; JUFFO, G. D.; SANTOS, A. S.; PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 155-160, 2013.

ARCANGIOLI, M., CHAZEL, M., SELLAL, E., BOTREL, M., BÉZILLE, P., POUMARAT, F., CALAVAS, D. AND LE GRAND, D. (2011). Prevalence of *Mycoplasma bovis* udder infection in dairy cattle: Preliminary field investigation in Southeast France. **New Zealand Veterinary Journal**, 59(2), 75– 78.

BEY, I. **Les ureaplasmes en pathologie bovine: Epidemiologie, diagnostic et mesures de controle**. Universite Claude-Bernard. Lyon. França. [THESE]. v.I, n.19, 2006. 90 p.

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

CARDOSO, M.V.; VASCONCELLOS, S.A. Importância das micoplasmoses na fertilidade de touros - Artigo de revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v.71, n.2, p.257-265, 2004.

CASWELL, J.L., ARCHAMBAULT, M., 2007. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. **Anim. Health Res. Rev.** 8, 161–186.

COELHO, P.C.M.S.; ANGRIMANI, D.S.R; MARQUES, E. S. Micoplasmose em felinos domésticos: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.16, p.1-14 jan.2011.

COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; PAIVA E BRITO, M.A.V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais. v.60, n.2. p.283-288, 2008.

DEL FAVA, C.; ARCARO, J.R.P.; POZZI, C.R.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E.M.; STEFANO, E. De; OKUDA, L.H.; VASCONCELLOS, S.A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semintensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v.70, n.1, p.25-33, 2003

FILIOUSSIS, G., CHRISTODOULOPOULOS, G., THATCHER, A., PETRIDOU, V., AND BOURTZICHATZOPOULOU, E. (2007). Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. **The Veterinary Journal**, 173(1), 215–218. doi:10.1016/j.tvjl.2005.08.001.

GILLE L. ***Mycoplasma bovis*: sources of infection, prevalence and risk factors.** [Merelbeke, Belgium]: Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine; 2018.

GIROTTI, A. et al., Molecular detection and occurrence of 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' in dairy cattle of Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v.21, n.3, p.342-344, jul-set, 2012.

GIROTTI-SOARES, A et al., 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*': transplacental transmission in dairy cows (*Bostaurus*). **Veterinary Microbiology**, v.195, p.22-24, 2016.

GONDAIRA S.;HIGUCHI H.;NISHI, K.; IWANO, H.; NAGAHATA, H. *Mycoplasma bovis* escapes bovine neutrophil extracellular traps. **Veterinary Microbiology**. v.199, p.68-73, 2017.

GOURLAY RN, THOMAS LH, WYLD SG, SMITH CJ. Effect of a new macrolide antibiotic (tilmicosin) on pneumonia experimentally induced in calves by *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella haemolytica*. **Res Vet Sci** 1989; 47: 84– 89.

HERMANN, R., 1992. Genome structure and organization. In: Maniloff, J. (Ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. **American Society of Microbiology**, Washington DC, USA, pp. 157–168.

HOLSBACH, V.T. K. **Prevalência de hemoparasitas em bovinos leiteiros no município de Toledo, Paraná, Brasil** – Londrina, 2017. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal.

HORNOK, S. et al. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v.152, p. 411-414, 2011.

JUNQUEIRA, N. B. ***Mycoplasma bovis* como agente causal de mastite clínica bovina.** Botucatu, 2017. 38p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

KAPOOR, P.K; GARG, D.N.; MAHAJAN, S.K. Isolation of *Mycoplasma subsp. mycoides* (LC variant, Y-goat) from naturally aborted bovine fetuses. **Theriogenology**, v. 32, n.4, p. 683-691, 1989.

KARAHAN, M., KALIN, R., ATIL, E. AND CETINKAYA, B. (2010). Detection of *Mycoplasma bovis* in cattle with mastitis and respiratory problems in eastern Turkey. **Veterinary Record**, 166(26), 827–829.

KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.167, p.95-107, 2010.

KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; VIU, M.A. Granular vulvovaginitis syndrome evaluation through the identification of the causal agents and lesion score in pubertal and prepubertal nelore females. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. **Anais...**Porto Seguro: CBRA, 2004. p. 244.

LEITE, T.E.; MORAES, J.C.F.; PIMENTEL, C.A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.31, n.3, p.467-472, 2001.

LIBERAL, M.H.T.; ROMINJN, P. C.; VOLLU, E.W. Presença de *Mycoplasma spp.* em pulmão de bezerro de até um ano de idade. **Comunicado Técnico**. Rio de Janeiro: PESAGRO, Q982. V. 08, N. 1/3.

MAUNSELL, F.P; DONOVAN, G.A.; RISCO, C.; BROWN, M.B. Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. **Vaccine**, 27: 2781-2788. 2009.

MERCIER, P.; PELLET, M.P.; MORIGNAT, E.; CALAVAS, D.; POUMARAT, F. Prevalência de micoplasmas no canal auditivo externo de cabras: influência do estado sanitário do rebanho. **Small Ruminant Research**, USA. n.73, p.296–299, 2007.

MESQUITA, S.M.C. et al. Padronização e aplicação de ELISA indireto para diagnóstico de *Mycoplasma bovis* em amostras de soro sanguíneo bovino. **Rev. Bras. Med. Vet.**, 37(2):101-107, abr/jun 2015.

METTIFOGO, E. & TAMASO, E. (2013). **Mastite por *Mycoplasma bovis*: surtos em Minas Gerais levam ao descarte de animais produtivos.**

NICHOLAS, R. A. J., AYLING, R. D., STIPKOVITS, L. P. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. **Vaccine**. 20: 3569-3575. 2002.

NICHOLAS, R.A.J., AYLING, R.D. **Mycoplasma Diseases of Ruminants**. Veterinary Laboratories Agency, CAB International, Wallingford, UK. 254p, 2003.

NICHOLAS, R. A. J. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. **Veterinary Record**, 168: 459-462. 2011.

NICHOLAS, R.A.J., AYLING, R.D., WOODGER, N., WESSELLS, M. E. and HOULIHAN, M.G. Mycoplasmas in adult cattle: Bugs worth bothering about? **Irish Veterinary Journal**. v.59, n.10, 2006.

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 do *Ureaplasma diversum* em muco vulvovaginal de vacas leiteiras repetidoras de estro no Estado de Alagoas – Brasil. **Archives of Veterinary Science**. v.10, n.2, p.151-156, 2005.

PARKER, A. M., SHEEHY, P. A., HAZELTON, M. S., BOSWARD, K. L., AND HOUSE, J. K. (2018). A review of *Mycoplasma* diagnostics in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 32(3), 1241–1252.

PFUTZNER, H., SACHSE, K., 1996. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders. **Scientific and Technical Review**. Offices International Des Epizooties 15, 1477– 1494.

PFÜTZNER, H. **Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle**. Zentralblatt fur Bakteriologie Supplement, v. 20, p. 394-399, 1990.

PUNYAPORNWITHAYA, V.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; ALLDREDGE, J. R. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. **Preventive Veterinary Medicine**. v.93, n.1, p.66-70, 2010.

PRETTO, L.G. et al. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras.** [online]. 2001, vol.21, n.4, pp.143-145. ISSN 0100-736X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2001000400003>.

PUNYAPORNWITHAYA, V.; FOX, L. K.; GAY, G. M.; HANCOCK, D. D.; ALLDREDGE, J. R. **The effect of centrifugation and resuspension on the recovery of *Mycoplasma* species from milk**. J Dairy Sci., v.92, n.9, p.4444– 4447, 2009

QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; PAUL ROSS, R.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. **J Appl Microbiol.**, v.113, n.1, p.96-105, 2012.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. **Clínica Veterinária - Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

ROSSINI, A.J. **Contribuição ao estudo de micoplasmose bovina: isolamento de *Mycoplasma bovis* em bezerros acometidos de pneumonia**. 1978. 49 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

SANTOS, J.P.V.A. Índices zootécnicos e impactos nos custos da reposição. Disponível em: <http://www.milkpoint.om.br/mn/radarestecnicos/artigo.html>. Acesso em: 14 de setembro de 2019.

SICKLES, S. A; KRUIZE, J.; GONZALEZ, R. N. Detecção de *Mycoplasma bovis* em amostras de leite em tanques a granel de rebanhos no sul do Chile. **Arch. med. vet.**, Valdivia, v.32, n.2, p.235-240, 2000.

SILVA, A. S. A.; ROMERO,É. A. (2009). Gerenciamento de custos da pecuária de leite em propriedade rural situada em Roncador - PR. **Rev em Agronegócios e Meio Ambiente**, 2(1):69–85.

SMITH, J.A. et al. Eperythrozoon wenyonii infection in dairy cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.196, p.1244-1250, 1990.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V.; BASTOS, R. R. (2005). Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arq Bras Med Vet Zoot**, 57(2):251– 260.

STONE, S.; MASSIGA, W.N.; READ.W.C.S. *Mycoplasma mycoides* transplacental transfer in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.10, p. 368, 1969.

TAGAWA, M.; MATSUMOTO,K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in cattle in Hokkaido, Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p.177-180, 2008.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo “C” produzido na região norte do Paraná. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 449-454, 2007.

TAVARES, F. M. Reflexões acerca da iatrogenia e educação médica. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v.31, n.2, p.180-185, 2007

TIMONEN, A. A. E. Within-herd prevalence of intramammary infection caused by *Mycoplasma bovis* and associations between cow udder health, milk yield, and composition. **Journal of Dairy Science**. Vol. 100 No. 8, 2017.

TRICHARD,C.J.V & JACOBSZ,E.P. Mycoplasmas recovered from bovine genitalia, aborted fetuses and placenta in the Republic of South Africa. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.52, p. 417-420, 1975.

VAHANIKKILA, N. & POHJANVIRTA, TARJA & HAAPALA, VERA & SIMOJOKI, HELI & SOVERI, T. & BROWNING, GLENN & PELKONEN, S. & WAWEGAMA, N.K. & AUTIO, TIINA. (2019). Characterisation of the course of *Mycoplasma bovis* infection in naturally infected dairy herds. **Veterinary Microbiology**. 231. 10.1016/j.vetmic.2019.03.007.

VILELA, D.; RESENDE, J. C. de. **Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década**. In: Simpósio Sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Seminário dos Centros Mesorregionais de Excelência em Tecnologia do Leite - Maringá. Universidade Estadual de Maringá, 2014.

WEN, J., ZHANG, J., AND HAO, Y. (2019). The status of *Mycoplasma bovis* infection in clinical mastitis cases in China. **International Journal of Dairy Technology**.

WITTER, R. et al. Prevalence of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47, n.3, p.1-6, 2017.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos realizados para diagnosticar a prevalência de doenças, bem como os fatores de risco associadas a ela representam uma importância muito grande para a saúde tanto animal quanto humana.

A micoplasmose bovina é uma doença de ampla ocorrência nos rebanhos leiteiros brasileiros, porém ainda pouco diagnosticadas, visto que em muitos locais a forma de diagnóstico da doença ainda é um pouco dificultada.

Há também a relação estabelecida entre os sinais clínicos apresentados pelo animal e o diagnóstico realizado, onde na maioria das vezes os problemas causados por esse agente acabam tendo sua causa direcionada a outro patógeno que causa semelhança no desenvolvimento da doença.

A bovinocultura leiteira tem obtido grandes perdas produtivas devido a problemas, em sua grande maioria problemas reprodutivos, causados por diversos patógenos e entre eles o *M.bovis*.

Conforme os resultados obtidos no presente estudo, há circulação do agente nas propriedades leiteiras da Região Oeste do Paraná, uma vez que das quatro cidades avaliadas somente uma não apresentou positividade para o patógeno em questão.

O fator de risco envolvido na infecção está relacionado ao manejo de uma forma geral da propriedade, principalmente aquele relacionado ao controle sanitário e características do sistema de produção.

O estudo realizado traz a fundamental importância em estar identificando a presença desse agente para que assim possam ser organizadas e realizadas estratégias para combater, controlar e prevenir o rebanho bovino contra esse tipo de infecção e manter o mesmo em condições saudáveis para que assim a produtividade possa aumentar gerando lucros aos produtores e principalmente fornecendo condições sanitárias adequadas ao rebanho.

REFERÊNCIAS

- AL-FARHA, A., HEMMATZADEH, F., KHAZANDI, M., HOARE, A., AND PETROVSKI, K. (2017). Evaluation of effects of *Mycoplasma mastitis* on milk composition in dairy cattle from South Australia. **BMC Veterinary Research**, 13: 351.
- AL-MOMANI, W.; NICHOLAS, R.A.J.; ABO-SHEHADA, M.N. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam. n.83, p.1–10, 2008.
- ANTONIASI, N. A. B.; JUFFO, G. D.; SANTOS, A. S.; PESCADOR, C. A.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Causas de aborto bovino diagnosticadas no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS de 2003 a 2011. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 155-160, 2013.
- ARCANGIOLI, M., CHAZEL, M., SELLAL, E., BOTREL, M., BÉZILLE, P., POUMARAT, F., CALAVAS, D. AND LE GRAND, D. (2011). Prevalence of *Mycoplasma bovis* udder infection in dairy cattle: Preliminary field investigation in Southeast France. **New Zealand Veterinary Journal**, 59(2), 75– 78.
- BEY, I. **Les ureaplasmes en pathologie bovine: Epidemiologie, diagnostic et mesures de controle**. Universite Claude-Bernard. Lyon. França. [THESE]. v.I, n.19, 2006. 90 p.
- BRASIL. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 de setembro de 2019.
- BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma spp.* e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais. v.59, n.6, p.1368-1375, 2007.
- CARDOSO, M.V. ***Mycoplasma bovis*, *M.bovigenitalium* e *Ureaplasma Diversum* em Touros. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico**. Tese(Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade De Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. 2003.
- CARDOSO, M.V.; VASCONCELLOS, S.A. (2004). Importância Das micoplasmoses Na Fertilidade De Touros. **Arquivos Do Instituto Biológico**. 71. 257-265.
- CASWELL, J.L., ARCHAMBAULT, M., 2007. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. **Anim. Health Res. Rev.** 8, 161–186.
- CHADDAD, F. Cooperativas no agronegócio do leite: mudanças organizacionais e estratégicas em resposta à globalização. **Organizações Rurais e Agroindustriais**, v. 9, p. 69-78, 2007.

COELHO, P.C.M.S.; ANGRIMANI, D.S.R.; MARQUES, E. S. Micoplasmose em felinos domésticos: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.16, p.1-14 jan.2011.

COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; PAIVA E BRITO, M.A.V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais. v.60, n.2. p.283-288, 2008.

DEL FAVA, C.; ARCARO, J.R.P.; POZZI, C.R.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E.M.; STEFANO, E. De; OKUDA, L.H.; VASCONCELLOS, S.A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semintensivo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo. v.70, n.1, p.25-33, 2003.

DE MESQUITA, S. M. C.; MANSUR, F. J.; DO NASCIMENTO, E. R.; BARRETO, M. L.; KIMURA, L. M. S. Padronização e aplicação de ELISA indireto para diagnóstico de *Mycoplasma bovis* em amostras de soro sanguíneo bovino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 37, n. 2, p. 101-107, 28 jun. 2015.

FILIOUSSIS, G., CHRISTODOULOPOULOS, G., THATCHER, A., PETRIDOU, V., AND BOURTZICHATZOPOULOU, E. (2007). Isolation of *Mycoplasma bovis* from bovine clinical mastitis cases in Northern Greece. **The Veterinary Journal**, 173(1), 215–218. doi:10.1016/j.tvjl.2005.08.001.

GILLE L. ***Mycoplasma bovis*: sources of infection, prevalence and risk factors.** [Merelbeke, Belgium]: Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine; 2018.

GIROTTI, A. et al., Molecular detection and occurrence of ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ in dairy cattle of Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v.21, n.3, p.342-344, jul-set, 2012.

GIROTTI-SOARES, A et al., ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’: transplacental transmission in dairy cows (*Bos taurus*). **Veterinary Microbiology**, v.195, p.22-24, 2016

GONDAIRA S.; HIGUCHI H.; NISHI, K.; IWANO, H.; NAGAHATA, H. *Mycoplasma bovis* escapes bovine neutrophil extracellular traps. **Veterinary Microbiology**. v.199, p.68-73, 2017.

GOURLAY, R. N.; THOMAS, L. H.; WYLD, S. G. Increased severity of calf pneumonia associated with the appearance of *Mycoplasma bovis* in a rearing herd. **Veterinary Record**, v. 124, p. 420-422, 1989.

HERMANN, R., 1992. Genome structure and organization. In: Maniloff, J. (Ed.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. **American Society of Microbiology**, Washington DC, USA, pp. 157–168.

HOLSBACH, V.T. K. **Prevalência de hemoparasitas em bovinos leiteiros no município de Toledo, Paraná, Brasil** – Londrina, 2017. 62p. Dissertação (Mestrado

em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal.

HORNOK, S. et al. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Veterinary Microbiology**, v.152, p. 411-414, 2011.

IBGE. Banco de dados Agregados. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 16 de agosto de 2019.

IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal, 2015. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br.htm>>. Acesso em: 04 de agosto de 2019.

JUNQUEIRA, N. B. ***Mycoplasma bovis* como agente causal de mastite clínica bovina**. Botucatu, 2017. 38p. Defesa (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

KAPOOR, P.K; GARG, D.N.; MAHAJAN, S.K. Isolation of *Mycoplasma subsp. Mycoides* (LC variant, Y-goat) from naturally aborted bovine fetuses. **Theriogenology**, v. 32, n.4, p. 683-691, 1989.

KARAHAN, M., KALIN, R., ATIL, E. AND CETINKAYA, B. (2010). Detection of *Mycoplasma bovis* in cattle with mastitis and respiratory problems in eastern Turkey. **Veterinary Record**, 166(26), 827–829.

KOCAN, K. M. et al. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Veterinary Parasitology**, v.167, p.95-107, 2010.

KUNZ, T.L.; GAMBARINI, M.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; VIU, M.A. Granular vulvovaginitis syndrome evaluation through the identification of the causal agents and lesion score in pubertal and prepubertal nelore females. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, Porto Seguro. **Anais...**Porto Seguro: CBRA, 2004. p. 244.

LACERDA, E.C.Q. **Efeito de inclusão de orégano na dieta de vacas leiteiras sobre a qualidade do leite**. Dissertação do Programa de Pós-Graduação “*Strictu Senso*” do Curso de Especialização em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2012.

LEITE, T.E.; MORAES, J.C.F.; PIMENTEL, C.A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.31, n.3, p.467-472, 2001.

LIBERAL, M.H.T.; ROMINJN, P. C.; VOLLU, E.W. Presença de *Mycoplasma spp.* Em pulmão de bezerro de até um ano de idade. **Comunicado Técnico**. Rio de Janeiro: PESAGRO, Q982. V. 08, N. 1/3

MANZI, M.P. **Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras do interior do estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014.

MERCIER, P.; PELLET, M.P.; MORIGNAT, E.; CALAVAS, D.; POUMARAT, F. Prevalência de micoplasmas no canal auditivo externo de cabras: influência do estado sanitário do rebanho. **Small Ruminant Research**, USA. n.73, p.296–299, 2007.

MESQUITA, S.M.C. et al. **Padronização e aplicação de ELISA indireto para diagnóstico de *Mycoplasma bovis* em amostras de soro sanguíneo bovino.** Rev. Bras. Med. Vet., 37(2):101-107, abr/jun 2015.

METTIFOGO, E. & TAMASO, E. (2013). **Mastite por *Mycoplasma bovis*: surtos em Minas Gerais levam ao descarte de animais produtivos.** São Sebastião do Paraíso: Qualy Milk, 2013. Disponível em: <<http://www.qualymilk.com/1/post/2013/09/mastite-por-mycoplasma-bovis-surtos-em-minas-gerais-levam-ao-descarte-de-animais-produtivos.html>>. Acesso em: 12 Agosto de 2013.

NAGATOMO, H. et al. Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. **Veterinary Microbiology**, 82, 223-232.2001.

NICHOLAS, R. A. J., AYLING, R. D., STIPKOVITS, L. P. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: clinical, cultural, serological and pathological findings. **Vaccine**. 20: 3569-3575. 2002.

NICHOLAS, R.A.J., AYLING, R.D. **Mycoplasma Diseases of Ruminants.** Veterinary Laboratories Agency, CAB International, Wallingford, UK. 254p, 2003.

NICHOLAS, R. A. J. Bovine mycoplasmosis: silent and deadly. **Veterinary Record**, 168: 459-462. 2011.

NICHOLAS, R.A.J., AYLING, R.D., WOODGER, N., WESSELLS, M. E. and HOULIHAN, M.G. Mycoplasmas in adult cattle: Bugs worth bothering about? **Irish Veterinary Journal**. v.59, n.10, 2006.

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 do *Ureaplasma diversum* em muco vulvovaginal de vacas leiteiras repetidoras de estro no Estado de Alagoas – Brasil. **Archives of Veterinary Science**. v.10, n.2, p.151-156, 2005.

PARKER, A. M., SHEEHY, P. A., HAZELTON, M. S., BOSWARD, K. L., AND HOUSE, J. K. (2018). A review of Mycoplasma diagnostics in cattle. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 32(3), 1241–1252.

PFÜTZNER, H. **Epizootiology of the *Mycoplasma bovis* infection of cattle.** Zentralblatt fur Bakteriologie Supplement, v. 20, p. 394-399, 1990.

PFÜTZNER, H., SACHSE, K., 1996. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders. **Scientific and Technical Review**. Offices International Des Epizooties 15, 1477– 1494.

PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P. & KLEIN, D.A. (2008). **Microbiology (7th edition)**. New York: McGraw-Hill.

PRETTO, L.G. et al. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. **Pesq. Vet. Bras.** [online]. 2001, vol.21, n.4, pp.143-145. ISSN 0100-736X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2001000400003>.

PUNYAPORNWITHAYA, V.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; ALLDREDGE, J. R. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. **Preventive Veterinary Medicine**. v.93, n.1, p.66-70, 2010.

QUIGLEY, L.; O’SULLIVAN, O.; BERESFORD, T. P.; PAUL ROSS, R.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. **J Appl Microbiol.**, v.113, n.1, p.96-105, 2012.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. **Clínica Veterinária - Um tratado de doenças de bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737p.

RAPOSO, J.M.C.R. **Prevalência de *Mycoplasma bovis* em 3 OPP Portuguesas: estudo sero-epidemiológico**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária), Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2009.

ROSENBUSCH R. F. **Biology and taxonomy of the Mycoplasmas**. In: Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH, editors. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames (IA): Iowa State University Press; 1994. p. 3– 11.

ROSSINI, A.J. **Contribuição ao estudo de micoplasmose bovina: isolamento de *Mycoplasma bovis* em bezerros acometidos de pneumonia**. 1978. 49 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

SALINA, A. **Avaliação microbiológica e molecular de isolados de *Mycoplasma spp.* A partir do leite de mastite clínica bovina**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2018.

SANTOS, J.P.V.A. **Índices zootécnicos e impactos nos custos da reposição**. Disponível em: <http://www.milkpoint.om.br/mn/radarestecnicos/artigo.html>. Acesso em: 14 de setembro de 2019.

SILVA, A. M. ET AL. Conjuntura da pecuária leiteira no Brasil. **Nutritime revista eletrônica**, On-line. Viçosa, v.14, n.1, p.4954-4958, jan./ fev. 2017. Issn: 1983-9006. Acesso em: 23 de setembro de 2019.

SNAK, A. **Prevalência e fatores de risco associados a infecção por *Neospora caninum* e *Trypanossoma vivax* em bovinos leiteiros e ocorrência de *n. caninum* e parasitos gastrointestinais em cães de propriedades rurais do Oeste do Paraná, Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Palotina, 2017.

SMITH, J.A. et al. Eperythrozoon wenyonii infection in dairy cattle. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.196, p.1244-1250, 1990.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V.; BASTOS, R. R. (2005). Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. **Arq Bras Med Vet Zoot**, 57(2):251– 260.

STONE, S.; MASSIGA, W.N.; READ.W.C.S. *Mycoplasma mycoides* transplacental transfer in cattle. **Research in Veterinary Science**, v.10, p. 368, 1969.

TAGAWA, M.; MATSUMOTO,K.; INOKUMA, H. Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' in cattle in Hokkaido, Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p.177-180, 2008.

TAMANINI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; MAGNANI, D. F.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V. Avaliação da qualidade microbiológica e dos parâmetros enzimáticos da pasteurização de leite tipo "C" produzido na região norte do Paraná. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 449-454, 2007.

TAVARES, F. M. Reflexões acerca da iatrogenia e educação médica. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v.31, n.2, p.180-185, 2007

TIMONEN, A. A. E. Within-herd prevalence of intramammary infection caused by *Mycoplasma bovis* and associations between cow udder health, milk yield, and composition. **Journal of Dairy Science**. Vol. 100 No. 8, 2017.

TRICHARD,C.J.V & JACOBSZ,E.P. *Mycoplasmas* recovered from bovine genitalia, aborted fetuses and placenta in the Republic of South Africa. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.52, p. 417-420, 1975.

VAHANIKKILA, N. & POHJANVIRTA, TARJA & HAAPALA, VERA & SIMOJOKI, HELI & SOVERI, T. & BROWNING, GLENN & PELKONEN, S. & WAWEGAMA, N.K. & AUTIO, TIINA. (2019). Characterisation of the course of *Mycoplasma bovis* infection in naturally infected dairy herds. **Veterinary Microbiology**. 231. 10.1016/j.vetmic.2019.03.007.

VILELA, D.;RESENDE, J. C. de. Cenário para a produção de leite no Brasil na próxima década. In: **Simpósio Sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na**

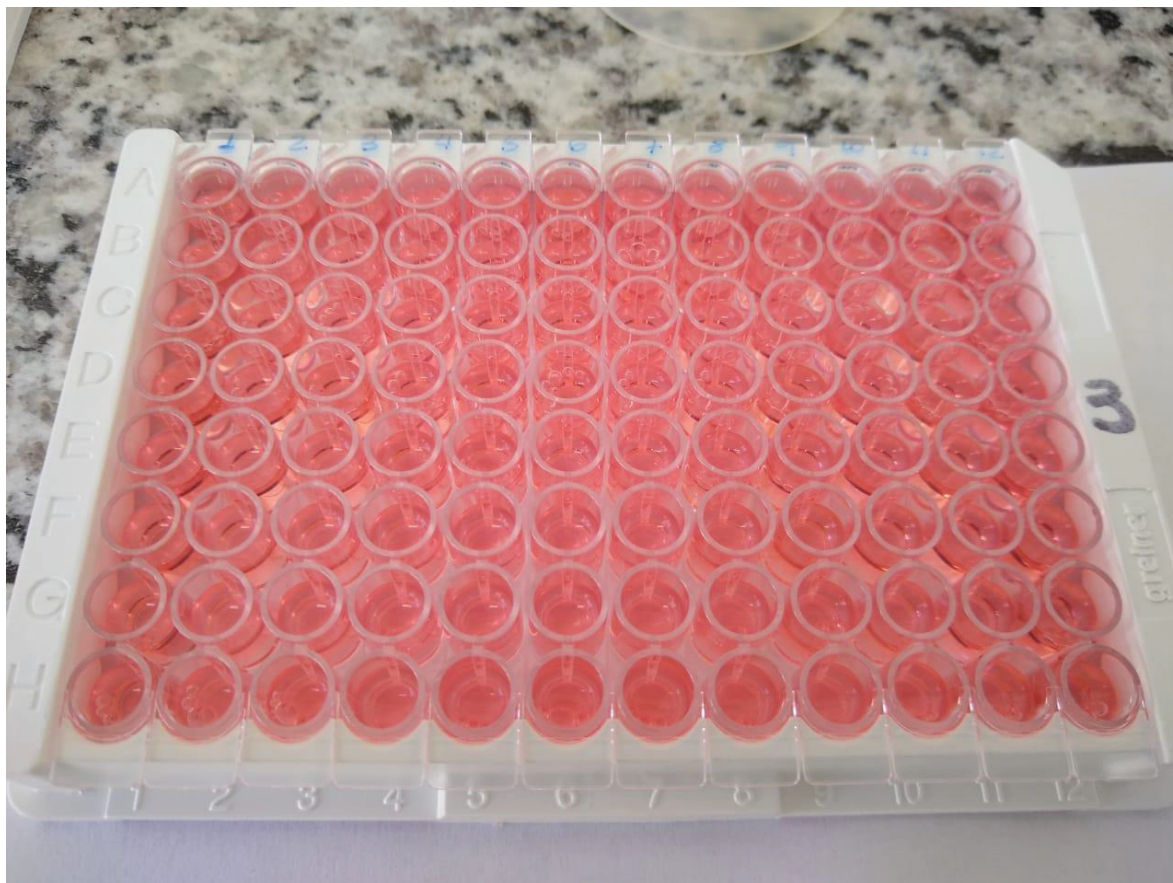
Região Sul do Brasil. Seminário dos Centros Mesorregionais de Excelência em Tecnologia do Leite - Maringá. Universidade Estadual de Maringá, 2014.

WEN, J., ZHANG, J., AND HAO, Y. (2019). The status of *Mycoplasma bovis* infection in clinical mastitis cases in China. **International Journal of Dairy Technology**.

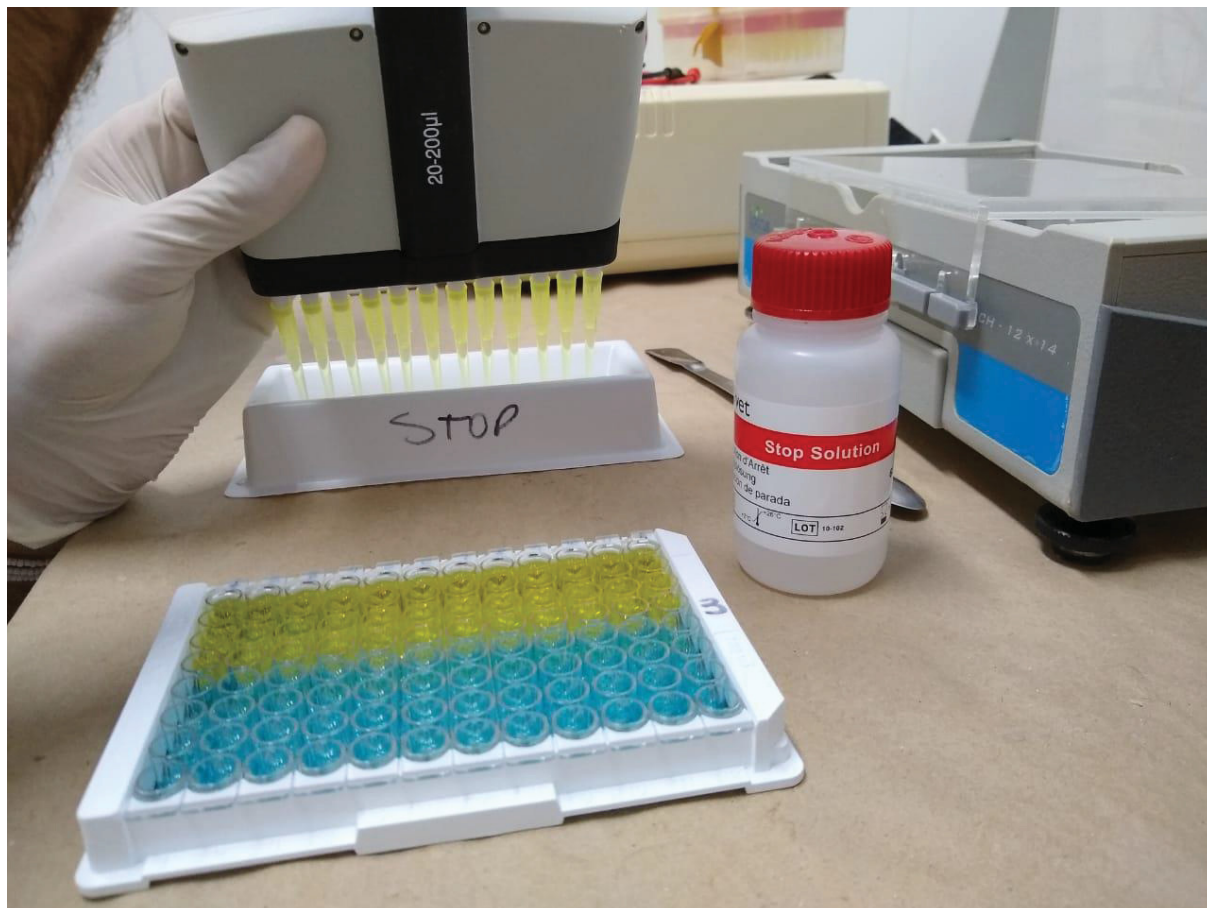
WITTER, R. et al. Prevalence of 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' detected by PCR, in dairy cattle from Ji-Paraná in the north region of Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.47, n.3, p.1-6, 2017.

YAMAGUTI M. Isolamento de micoplasma de suínos com problemas respiratórios e tipificação dos isolados pela PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA. Tese (doutorado), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo- SP, 2009.

ZOCCAL, R. O leite no Brasil. In: **ANUÁRIO brasileiro do leite**. Passo Fundo: O Nacional, 2008.

APÊNDICE A – MICROPLACA KIT COMERCIAL ID.VET®

APÊNDICE B – ADIÇÃO DE SOLUÇÃO DE PARADA PARA INTERRUPTÃO DA REAÇÃO.



APÊNDICE C - DESCRIÇÃO DO ELISA INDIRETO

Realizou-se a pipetagem de 195 µL de solução de diluição na microplaca, seguindo de 5 µL da amostra em cada poço. Dois poços foram destinados ao controle negativo (CN) e dois para o controle positivo (CP) sendo adicionados 195 µL da solução de diluição e 5 µL da solução CN e CP, respectivamente. Um poço foi designado como branco (B) sendo adicionado apenas 200 µL da solução de diluição. A placa foi incubada por 45 minutos em temperatura ambiente (21°C) ± 5 °C. Após ocorreu a lavagem por três vezes com 300 µL da solução de lavagem. Em seguida foi adicionado 100 µL do conjugado em cada poço, a placa foi incubada novamente durante 30 minutos (± 3 minutos) em temperatura ambiente (21°C) ± 5 °C. As placas foram novamente lavadas com 300 µL da solução de lavagem por três vezes. Na sequência foi adicionado 100 µL da solução de substrato em cada poço e realizada a incubação, no escuro, da placa por 15 minutos (± 2 minutos) em temperatura ambiente (21°C) ± 5 °C. Adicionaram-se 100 µL da solução de parada em cada poço para interromper a reação e a mesma foi levada ao leitor de microplacas para realizar a leitura das amostras a um comprimento de onda de 450 nm ± 10 nm.

APÊNDICE D - QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LABIOTEC - Laboratório de Biotecnologia

Setor de Diagnóstico Viroológico e Parasitológico

QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO:

N. Ficha _____ Data ____/____/____

1 - Entrevistado e função:

2 - Proprietário:

3 - Endereço:

4 - Constituição da população humana:

Proprietários

	Homens	Mulheres
<12 anos		
12 - 20 anos		
20 -40 anos		
40 - 60 anos		
> 60 anos		

6 – Quantos animais há?

	Machos	Femeas
<6 meses		
6 – 12 meses		
1 – 2 anos		
2 – 5 anos		
> 5 anos		
<6 meses		

6.1 – Qual a raça dos animais? () Holandesa () Jersey () Pardo Suíça ()
outra _____

7 – Há cães na propriedade? () sim () não

7.1 – Os cães possuem algum contato com os bovinos? () sim () não

8 – Há gatos na propriedade? () sim () não

8.1 – Os gatos possuem algum contato com os bovinos? () sim () não

9 – Qual o tipo de produção? () intensiva () semi-intensiva () extensiva

10 – Quantos litros de leite é produzido por dia? _____

11 – A reposição de animais é realizada com que frequência na
propriedade? () 6 meses () 1 ano () 2 anos

11.1 – São feitos exames como de brucelose antes do animal chegar na
propriedade? () sim () não

12 – Já teve ou ainda há casos de aborto na propriedade? () sim () não

- 12.1 – Qual a frequência de aborto? _____
- 12.2 – A causa do aborto foi diagnosticada? () sim () não
- 12.3 – Qual doença? _____
- 13 – Qual manejo reprodutivo é realizado? () IATF () IA () touro
- 13.1 – O touro é repostado com qual período? _____
- 13.2 – É realizado exame andrológico e brucelose antes de adquiri-lo?
() sim () não
- 14 – Todas as fêmeas jovens são vacinas para brucelose? () sim () não
- 15 – O diagnóstico de brucelose na propriedade é realizado com qual frequência? () 6 meses () 1 ano () 2 anos

PARA CÃES

- 18 – O animal foi vacinado quando filhote? () sim () não
- 18.1 – Qual vacina? () importada () nacional
- 18.2 - Quem vacinou? () veterinário () agropecuária () próprio dono
() outro qual? _____
- 19 – O animal é vacinado todo ano? () sim () não
- 19.1 – Quais vacinas? () raiva () cinomose/parvovirose () outra qual?

- 20 – O animal fica em qual ambiente? () grama () pedra () concreto () terra
- 21 – Onde o animal fica? () preso por corrente () solto
- 22 – Os animais já teve presença de vermes nas fezes? () sim () não
- 23 – O animal é vermifugado com qual frequência? () >3meses () 3-6
meses () 6-12 meses () >1 anos
- 24 – O animal já apresentou alguma doença? () sim () não
- 24.1 – Qual doença? _____
- 25 – O animal já foi ao veterinário? () sim () não
- 26 – Qual a alimentação do animal? () ração () comida () polenta () carne
crua () outro _____
- 27 – O animal já teve problema com pulga? () sim () não
- 28 – O animal já teve problema com sarna? () sim () não
- 29 – O animal já teve problema com carrapato? () sim () não

PARA HUMANOS

30 – As frutas e verduras são lavadas antes da ingestão? () sim () não

30.1 - Como são lavadas? () água corrente () água sanitária () outro

31 – Qual a fonte da água de consumo? () sanepar () poço raso () poço artesiano () outro

32 – Há consumo de carne crua ou mal passada? () sim () não