



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Análise epidemiológica da infecção por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* em bovinos na microrregião do Vale do Ipanema - Pernambuco

ALLISON ALVES DE MACÊDO

RECIFE – PE
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Análise epidemiológica da infecção por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* em bovinos na microrregião do Vale do Ipanema - Pernambuco

ALLISON ALVES DE MACÊDO

“Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical”.

Orientador: Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Co-orientadora: Dr^a. Sandra Batista dos Santos

RECIFE – PE
2017

BANCA EXAMINADORA

Análise epidemiológica da infecção por *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* em bovinos na microrregião do Vale do Ipanema - Pernambuco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central dessa universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

Allison Alves de Macêdo

Data de aprovação ____/____/____

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior (Orientador)
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr^a Sandra Batista dos Santos
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Aos meus pais,
Suerleide de Fátima Alves de Macêdo
E
José Arnaldo Macêdo,
Que me ensinaram o caminho certo a percorrer e sempre me apoiaram nas decisões,
Com amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concebido o dom da vida, saúde e força para superar todas as dificuldades até chegar aqui.

Aos meus irmãos, avó, tios e tias, primos e primas, que sempre me incentivaram e me deram carinho para continuar seguindo em frente na constante busca pelo conhecimento.

Aos meus pais, José Arnaldo Macêdo e Suerleide F. Alves de Macêdo, que Deus colocou em minha vida me apoiando sempre.

Ao meu grande orientador, José Wilton Pinheiro Junior, obrigado pela paciência, competência, dedicação e transparência. Com seus ensinamentos, cresci pessoal e profissionalmente. Meu sincero agradecimento.

À minha Co-orientadora e amiga, Dr^a. Sandra Santos, pela paciência, dedicação e atenção comigo. Foram meses de aprendizado que jamais esquecerei. Apesar dos “momentos corridos”, sempre conseguimos trabalhar e, hoje, posso reproduzir o que competentemente você me ensinou. Muito obrigado por tudo.

Ao grande homem, professor Dr. Rinaldo Mota, por ter aberto as portas do laboratório no qual processei as amostras, muito obrigado. Acredito no seu envolvimento sério com a pesquisa científica e na honra com que conduz seus orientandos.

Ao meu professor, mestre e amigo, Dr. Daniel Brandespim, pelo seu constante apoio e pela consideração. Parte desta realização profissional é sua responsabilidade. Além disso, agradeço o seu comprometimento em me orientar durante todo o estágio docência.

Gostaria de agradecer também aos proprietários de todas as fazendas nas quais pude realizar este estudo. Obrigado pela atenção, hospitalidade, generosidade e, acima de tudo, confiança. Inclusive, agradeço a minha colega de profissão e amiga, Elizabete Teixeira por intermediar nossa comunicação com os proprietários.

Aos meus amigos e colegas de profissão, Amanda de Deus, Everton Diogo, Robespierre Augusto e Pamella de Sá, obrigado por me abrigarem em sua residência. Deram-me o maior quarto da casa (sala). Nunca esquecerei os momentos fantásticos que passamos. Vocês, sem dúvida, contribuíram e contribuem demais para o meu crescimento como pessoa e como profissional. Acima de tudo isso, agradeço pela amizade sincera e pelos momentos de descontração. Amo vocês.

Agradeço, também, aos meus amigos Bárbara Oliveira, Igor Luiz e Lucas Araújo por me ajudarem com o inglês e pelos momentos de descontração (que foram muitos!), bem como pela paciência nos momentos em que não pude estar presente. Amo vocês!

À minha cara amiga, Irlana Loiuse (Dací), por ser essa pessoa formidável e ÚNICA na minha vida. Muito obrigado pela torcida. Embora esse estudo tenha nos afastado, sempre continuamos unidos. Que sua filha tenha a mesma esperança que você possui em seus olhos.

Aos meus amigos, Harison Oliveira, pelo constante apoio, por estar sempre presente pelos momentos de descontração, sempre me colocando para cima nas horas mais tensas que passei e se dispondo para qualquer eventualidade; e Naiara Mirely e Stephanie Gueiros, que são “um pilha de diversão”. Como é bom agradecer a vocês o apoio constante e essa animação contagiante. Tenham certeza que sempre melhoraram meu humor e que também são especiais para a minha vida.

Por fim, minha cara Érica Chaves que, muitas vezes, tirou minhas dúvidas com relação à pós-graduação, sempre atenta e me trazendo para a realidade. Sua competência é notável, um exemplo de profissional, sempre presente também nos momentos de descontração e também constantemente mostrando acreditar no meu potencial. Muito obrigado! Essa galera amada tem um futuro brilhante e de sucesso.

À minha pessoa rara, Joelma Mello, deixo meus agradecimentos pela guerreira que você é! Uso sua amizade como um espelho, um símbolo puro de resiliência. Sempre certa, pontual e certa de si. Agradeço cada palavra de apoio, cada momento de descontração e cada sorriso que conseguiu tirar do meu rosto. Muito obrigado.

Aos meus companheiros de trabalho, Junior Mário (Saloá), Breno Aragão, Bruno Pajeú, Thomás Souza, Larice Bruna, Grasiene Menezes e Jonas Borges, que se mostraram companheiros fieis nas coletas e processamento do material. Foram muitos momentos de cansaço e de alegria dos quais não nos esqueceremos. Não poderia, aqui, deixar de citar o possante (Fiat Uno de Saloá), o qual proporcionou com muita garra nossas trajetórias madrugadas adentro. Esse carro faz pesquisa.

Agradeço às meninas, Renata (Renatinha), Camila Pedrosa e Gabi Silva que, muitas vezes, tiraram minhas dúvidas e que, quando precisei, sempre se fizeram presentes, agradeço pelo apoio dentro do laboratório e ajuda quando necessário, muitas vezes, controlando a temperatura da estufa. Sou muito grato!

Enfim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o sucesso deste estudo.

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se”

Voltaire.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE QUADRO... ..	11
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES.....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Etiologia	17
2.2 Epidemiologia.....	18
2.3 Patogenia e sinais clínicos	19
2.4 Diagnóstico.....	22
2.5 Profilaxia	23
3. Objetivos	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
CAPÍTULO I.....	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
APÊNDICES.....	50
ANEXO.....	56

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Area of study, microregion of the Ipanema Valley - Pernambuco-PE, Brazil.....	29
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Occurrence of infection by Mollicutes in dairy cows in the Ipanema Valley microregion, Pernambuco.....	32
Tabela 2. Analysis of risk factors associated with Mollicutes infection.....	33
Tabela 3. Reproductive history associated with Mollicutes infection.....	34

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Registros da infecção por Mollicutes associados a problemas reprodutivos em diferentes localidades.....	18
--	-----------

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
Mb	Mega pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
VVG	Vulvovaginite granular

RESUMO

Objetivou-se, com este estudo, realizar uma investigação epidemiológica da infecção por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* em bovinos na microrregião do Vale do Ipanema, estado de Pernambuco. Foram coletados swabs vaginais de 355 vacas em idade reprodutiva que foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e isolamento microbiológico. Um questionário investigativo foi utilizado para a análise dos fatores de risco associados à infecção por Mollicutes. Pela PCR, 9,29% (33/355) amostras foram positivas para *Mycoplasma bovis* e 21,69% (77/355) para *Ureaplasma diversum*. Observou-se coinfeção em 2,81% (10/355) das amostras. A partir do isolamento microbiológico das amostras positivas na PCR, houve crescimento no meio Hayflick de 81,81% (27/33) das amostras, sendo classificadas como *Mycoplasma* spp. e 24,67% (19/77) cresceram no meio “UB”, sendo classificadas como *U. diversum*. Foram considerados fatores de risco associados à infecção por Mollicutes: sistema de criação semi-intensivo (OR=4,6); aluguel de pastagens (OR=3,6); não isolamento dos animais com distúrbios reprodutivos (OR=3,2) e realização de monta natural mais inseminação artificial (OR=3,5). Este é o primeiro registro da infecção por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* em rebanhos bovinos na região semiárida do estado de Pernambuco, Brasil. A partir dos resultados obtidos, medidas de prevenção direcionadas aos fatores de riscos identificados podem contribuir com a diminuição da ocorrência de Mollicutes nos rebanhos bovinos estudados.

Palavras-chave: PCR, isolamento, Mollicutes, aborto, fatores de risco, prevenção.

ABSTRACT

This study's objective was to conduct a *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* infections epidemiological investigation in cattle in the Ipanema Valley microregion, Pernambuco state. Vaginal swabs were collected from 355 reproductive age cows and submitted to polymerase chain reaction (PCR) and microbiological isolation. An investigative questionnaire was used to risk factors analysis associated with Mollicutes infection. According to PCR, 9.29% (33/355) of the samples were positive for *Mycoplasma bovis* and 21.69% (77/355) for *Ureaplasma diversum*. Coinfection was observed in 2.81% (10/355) of the samples. According to isolation, there was growth on Hayflick medium of 81.81% (27/33) from the samples classified as *Mycoplasma* spp. and 24.67% (19/77) growth on UB medium, being classified as *Ureaplasma diversum*. Risk factors associated to Mollicutes infection were considered: semi-intensive breeding system (OR = 4.6), pasture rent (OR = 3.6), reproductive disorders nonisolated animals (OR = 3.2), and natural mating plus artificial insemination (OR = 3.5). This is the first record of *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* infection in semiarid region cattle herds of Pernambuco state, Brazil. From this, preventive measures directed to the identified risk factors can contribute to Mollicutes' occurrence decrease in the cattle herds studied.

Keywords: PCR, isolation, Mollicutes, abortion, risk factors, prevention.

1. QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

O estado de Pernambuco é o segundo maior produtor de leite do Nordeste, respondendo por 17% da produção da região, com mais de 656 milhões de litros por ano dos 35,17 bilhões produzidos nacionalmente (IBGE, 2014). A microrregião do Vale do Ipanema foi a maior produtora de leite do estado de Pernambuco em 2008, o que corresponde a 32% da produção de todo o estado (SEBRAE, 2010). A microrregião apresenta uma baixa capacidade hídrica, contudo, mantém uma economia local que se destaca como a maior produção leiteira pernambucana e grande contribuinte da agricultura familiar (VERSLYPE; COELHO JÚNIOR; WANDERLEY, 2016).

As tendências da pecuária leiteira e de outras atividades agropecuárias podem contribuir com uma redução no número de animais por rebanho, ou seja, de vacas leiteiras, e um aumento de produtividade neste mesmo rebanho, mesmo com um menor número de animais (MASSUQUETO et al., 2007), o que leva, de certa forma, ao aumento das exigências nutricionais e maior exposição do animal a situações estressantes, favorecendo uma diminuição do seu estado imunológico, o que resulta, indiretamente, no aparecimento de enfermidades e, conseqüentemente, num decréscimo da rentabilidade do produtor (SOUZA et al., 2005).

Sobre isso, pode-se dizer que o manejo higiênico-sanitário e reprodutivo dos rebanhos é citado como um dos fatores que mais interferem nos sistemas de criação de vacas leiteiras (SILVA; ROMERO, 2009), uma vez que as desordens reprodutivas são responsáveis por significativos prejuízos econômicos (KUNZ et al., 2004).

Destaca-se como desordens reprodutivas as infecções por Mollicutes, que propiciam uma diminuição na eficiência reprodutiva, no que diz respeito ao aumento do intervalo de partos, que é um dos parâmetros mais importantes no desempenho econômico da propriedade de produção de leite (LEITE; MORAES; PIMENTEL, 2001). A repetição de cio é um sinal clínico evidente em rebanhos com micoplasmose bovina e interfere em um menor ganho econômico do produtor, pois a vaca permanece vazia por um período prolongado (RAJALA-SCHULTZ; GRÖHN, 1999), além da redução no número de bezerros nascidos, o que ocasiona uma diminuição na rentabilidade da propriedade (GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000).

Os custos estimados para a indústria de carne no EUA relacionados à micoplasmose bovina foram de US\$ 32 milhões/ano e como resultado houve perda de peso além de

diminuição do valor de carcaça, para a indústria de laticínios, as perdas foram de US\$ 108 milhões/ano quando a micoplasmose bovina esteve associada à mastite. De forma geral, também há prejuízos econômicos relacionados com a ocorrência de perdas fetais ou partos prematuros, compra de novas doses de sêmen, gastos com médico veterinário e antibióticos (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004).

Estudo realizado no estado da Paraíba por Santos et al. (2013) detectou a presença de *Mollicutes* (65,6%) e *Ureaplasma* spp. (50,0%), associada à doença reprodutiva em bovinos. Em Viçosa, estado de Alagoas, Oliveira Filho et al. (2005) isolaram *Ureaplasma diversum* de vacas leiteiras com repetição de estro, relatando 41,7% das amostras positivas para o agente em questão, sendo positivamente associada às lesões de vulvovaginite granular. Recentemente, Santos et al. (2015), relataram presença de *Mollicutes* em rebanho de vacas leiteiras com presença de distúrbios reprodutivos no Agreste de Pernambuco, microrregião de Garanhuns.

Considerando que bactérias do gênero *Mollicutes* podem ocasionar distúrbios reprodutivos em bovinos e conseqüentemente ocasionam prejuízos aos proprietários e que a microrregião do Vale do Ipanema faz parte da bacia leiteira do estado de Pernambuco, objetivou-se com este estudo realizar uma investigação epidemiológica da infecção por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* em bovinos na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etiologia

A micoplasmose animal é causada por procariotos pequenos e simples (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999) pertencentes à classe Mollicutes, ordem Mycoplasmatales (EDWARD; FREUNDT, 1967), família Mycoplasmataceae, que compreende gêneros como *Achaloplasma* spp., *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp. (FREUNDT, 1955). Esses micro-organismos são desprovidos de parede celular, o que os tornam resistentes às penicilinas, cefalosporinas, vancomicina e outros antibióticos que interferem na síntese da parede celular, além disso, são fracamente corados pelo método de coloração Gram (KUHNS; HOPKINS, 1983), porém são considerados Gram-negativos (CARDOSO et al., 2000).

São anaeróbios facultativos, podendo sobreviver, dessa forma, em meios com presença de dióxido de carbono e pouco oxigênio (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999), e as condições ótimas de seu isolamento em até 15 dias são a 37°C em jarras de microaerofilia, sob atmosfera de 95% de N₂ +5% CO₂ e O₂ residual, após a remoção do ar do interior da jarra, utilizando-se de bomba de vácuo (CARDOSO et al., 2000). Estas bactérias se multiplicam dividindo-se por fissão binária e possuem genoma pequeno variando de 0,58-1,35Mb (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999). O material genético é constituído por DNA circular de fita dupla e RNA; o genoma é pequeno, conferindo capacidade biossintética limitada (ROTTEM, 2003).

A membrana citoplasmática possui grande flexibilidade funcional, com proteínas em sua estrutura, e, dentre essas proteínas, encontram-se as de superfície para a aderência bacteriana à célula-alvo (VEREB et al., 2003). A coloração pode ser feita pela técnica de Dienes, sendo considerada a melhor e a mais específica para diagnóstico de Mollicutes em bovinos (HOWARD; GOURLAY, 1982; RAZIN; TULLY 1996). Pode ser utilizada também a técnica de Giemsa, tendo também a caracterização de colônias pequenas com aparência característica de “ovo frito”, consistindo em uma zona granular e opaca na região central e outra periférica, plana e translúcida (WHITFORD, 1994).

Os micoplasmas são suscetíveis às condições adversas do meio e sua membrana plasmática pode se romper por choque osmótico, contato com detergentes, álcoois e

anticorpos específicos ligados ao complemento e são, também, sensíveis às variações bruscas de pH e temperatura (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999).

2.2 Epidemiologia

A ocorrência da infecção por Mollicutes é relatada em bovinos em diversas partes do mundo, com registros de prevalência variando de 3,4 a 72,8% para *Mycoplasma* spp. e de 6,0 a 74% para *Ureaplasma diversum* (quadro 1).

Quadro 1: Registros da infecção por Mollicutes associados a problemas reprodutivos em diferentes localidades.

Autor	ANO	LOCAL	MÉTODO	PREVALÊNCIA (%)	
				<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>U. diversum</i>
LANGFORD	1975	Canadá	Isolamento	21,0*	-
RUHNKE et al.	1978	Ontario	Isolamento	7,7	74,0
DOIG et al.	1979	Canadá	Isolamento	7,7	74,0**
RAE et al.,	1993	Flórida	Isolamento	-	44,0
CARDOSO et al,	2000	SP – Brasil	Isolamento	-	38,8
SANDERSON et al.	2000	EUA	Isolamento	-	51,0-65,0
OLIVEIRA FILHO et al.	2005	AL – Brasil	Isolamento	-	41,6
NASCIMENTO et al.	2005	MG – Brasil	Isolamento	57,1	-
BUZINHANI; METIFFOGO; TIMENETSKY	2007	SP – Brasil	PCR Isolamento	63,7 12,5	37,5 25,0
PETIT et al.	2008	Áustria	PCR	3,4	11,9
ARGUE; CHOUSALKAR; CHENOWETH	2009	Austrália	PCR	-	15,0
GAMBARINI et al.	2009	Brasil-Oeste	Isolamento	15,6	64,4
LYSNYANSKY et al.	2009	Israel	Isolamento	55,0	-
SMITH; CHOUSALKAR; CHENOWETH	2012	Austrália	PCR	-	35,2
MARQUES et al,	2013	SP e BA – Brasil	PCR	72,8*	38,1
SANTOS et al.	2013	PB – Brasil	PCR	65,6*	15,6
GHANEM et al.	2013	Japão	PCR	7,4	-
GAETI et al.	2014	MT - Brasil	PCR	-	38,0
SANTOS et al.	2015	PE - Brasil	Isolamento PCR	13,0 26,0*	6,0 13,0
AZEVEDO et al.	2016	MT- Brasil	PCR	-	9,8

*Mollicutes; ** *Ureaplasma* spp. (A) PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

As vias de eliminação de *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasmas diversum* são especialmente secreções das mucosas nasal, vaginal e no leite (MILLER et al., 1994). A disseminação desses agentes ocorre pela ordenha e secreções de animais com descargas

genitais. Pode ocorrer também por aerossóis, porém essa forma está mais associada à espécie *Mycoplasma bovis* (SACHSE, 1993).

Os agentes etiológicos da micoplasmose bovina se propagam de forma horizontal facilmente pelo contato direto, ou, de forma indireta, pelos fômites, mãos do ordenhador ou a falta de higiene durante a infusão intramamária de antibióticos, nos casos de mastite (MAUNSELL; DONOVAN, 2009). A transmissão venérea pela monta natural pode ocorrer (CARDOSO et al., 2000), uma vez que o sêmen é considerado um dos mais importantes meios de transmissão de *Mycoplasma* spp. (BIELANSKI; DEVENISH; PHIPPS-TODD, 2000), podendo ainda ser transmitido pela inseminação artificial e transferência de embriões (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004, MARQUES et al., 2009).

A porta de entrada nos hospedeiros é pelas mucosas, principalmente vaginal/vulva e uretra peniana (MURRAY, 2012).

O animal infectado por Mollicutes, geralmente assintomático, torna-se a fonte de infecção no rebanho (NICHOLAS et al., 2006; AL-MOMANI; NICHOLAS; ABO-SHEHADA, 2008). Sobre isso, Blum et al. (2008) afirmam que a introdução e a aglomeração de animais de diferentes sistemas de produção em uma mesma unidade produtora de leite constituem importantes fatores de disseminação desses patógenos.

Alguns fatores são considerados de risco para micoplasmose animal, sendo uma doença mais frequente em animais economicamente explorados, vacas de grande produção leiteira alimentadas com rações ricas em proteínas, animais com traumas mamários e expostos a ambientes contaminados (CARDOSO, et al., 2006).

A presença de fatores estressantes na alimentação (fornecimento e o tipo do alimento), a movimentação constante dos animais (AEBI et al., 2015) e a idade (LEÓN et al., 1995; AL-MOMANI; NICHOLAS; ABO-SHEHADA, 2008) também são considerados fatores de risco para a ocorrência da infecção de Mollicutes no rebanho bovino.

2.3 Patogenia e sinais clínicos

Embora a patogenia dos micoplasmas e ureaplasmas ainda seja pouco conhecida, a patogenicidade dos microrganismos da classe Mollicutes está relacionada com a forte capacidade de aderência desses agentes aos tecidos onde se encontram, impedindo, assim, que sejam eliminados pelo fluxo de muco genital ou urinário. Neste processo, produzem

substâncias que lesionam os tecidos do hospedeiro, como amônia e peróxido de hidrogênio (MESEGUER et al., 2003). Uma organela com aspecto de proeminência na morfologia polar da célula dos micoplasmas é formada de proteínas adesinas e proteínas acessórias - essas colaboram estruturalmente para aumentar a quantidade de proteínas adesinas e facilita a fixação destes agentes infecciosos nos tecidos dos hospedeiros (ROTTEM, 2003).

As infecções por *Ureaplasma* spp. levam à produção de ácido araquidônico, diacilglicerol e lisofosfolídeos, substâncias que alteram a biossíntese de prostaglandinas; essas, por sua vez, são potentes reguladores das atividades celulares, principalmente aquelas que envolvem os processos reprodutivos, como a implantação e manutenção da prenhez (WAITES; KATZ; SCHELONKA, 2005).

A infecção no rebanho tende a se tornar enzoótica, pois o epitélio retorna à normalidade por volta de seis semanas a três meses após a infecção, ocorrendo reinfeção (DOIG et al., 1979). Uma nova sequência do genoma da estirpe *U. diversum*, foi relatada para entender melhor a especificidade de hospedeiro desse agente e o que define sua patogenicidade em bovinos, contribuindo também com o surgimento de novas estratégias para o tratamento, prevenção e controle destas infecções (MARQUES et al., 2015).

O micoplasmose bovina pode ser de curso agudo ou crônico e seus agentes etiológicos possuem tropismo pelos sistemas urogenital, respiratório, glândula mamária, articulações, sistema nervoso e conjuntiva ocular (BUZINHANI; METIFFOGO; TIMENETSKY, 2007), tornando-se difícil de ser erradicada quando introduzida por um animal assintomático, se estabelecendo em animais de várias idades no rebanho (NICHOLAS; AYLING, 2003). Quando a fase aguda da doença predomina no rebanho, pode-se observar redução da fertilidade (OLIVEIRA FILHO et al., 2005).

Em bovinos, a micoplasmose causa mastite, pneumonia, artrite (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004); agalaxia contagiosa, endometrite, salpingite, placentite e, conseqüentemente, baixa taxa de concepção (CARDOSO, et al., 2006). Nas infecções por *Ureaplasma diversum*, observa-se aborto, repetição de cio, vulvovaginite granular, infertilidade, casos de salpingite, endometrite, cervicite, morte embrionária e morte neonatal (RUHNKE et al., 1978; CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994). *Ureaplasma diversum* é única espécie do gênero *Ureaplasma* spp. isolada de bovinos (RAE et al., 1993).

A vulvovaginite granular é uma inflamação caracterizada por hiperemia, grânulos de 1 a 2mm de diâmetro, colorações cinza, marrom ou vermelha, os quais podem persistir por vários dias (DOIG et al., 1979; LYSNYANSKY et al., 2009). Esses grânulos possuem

conteúdo celular representado pelos linfócitos e plasmócitos na mucosa reprodutiva (NASCIMENTO; SANTOS, 2003), os quais tendem a se desenvolver de 4 a 10 dias após o cio em fêmeas na fase reprodutiva (GAMBARINI et al., 2009).

No estudo de Oliveira Filho et al. (2005), a presença do *Ureaplasma diversum* foi associada à ocorrência da síndrome vulvovaginite granular, independente da presença de grânulos na mucosa vulvovaginal das vacas analisadas. A VVG também já foi diagnosticada em trabalho experimental com bovinos (DOIG; RUHNKE; PALMER, 1980).

A ocorrência de *M. bovis genitalium* está associada com patologias do sistema reprodutivo de bovinos (LANGFORD, 1975), sendo, anteriormente, considerado como o agente primário da vulvovaginite (DOIG et al., 1979), endometrite, infertilidade, vulvovaginite granular (NICHOLAS et al., 2006; GIVENS; MARLEY, 2008) e anormalidades do sêmen (NICHOLAS et al., 2006).

O aborto por essas bactérias não era diagnosticado com frequência, refletindo em uma associação pouco esclarecida entre o aborto e a presença desses agentes (RUHNKE et al., 1978). Embora seja necessária a realização de mais estudos envolvendo a detecção desses agentes em placentas e fetos (SANTOS et al., 2013), a presença de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em fêmeas bovinas com histórico de aborto já foi relatada em outros estudos, fazendo com que este distúrbio reprodutivo seja um aspecto importante (BUZINHANI; METIFFOGO; TIMENETSKY, 2007; SANTOS et al., 2013).

O aborto ocasionado por *U. diversum* é resultado da placentite e da pneumonia fetal, que ocorrem, geralmente, no último trimestre da prenhez (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Em alguns casos, *U. diversum* estimula a síntese de prostaglandina F2a, hormônio que causa lise do corpo lúteo; em outros, inibe a síntese da prostaglandina E2, um dos principais hormônios relacionados ao reconhecimento materno da gestação (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994).

Além de causar um processo inflamatório (POWELL; CLYDE, 1975), micoplasmas possuem carácter invasivo (BUZINHANI et al., 2011) e, assim, podem não destruir a célula, mas resultando em estresse, possibilitando o aparecimento de infecções secundárias (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999) pela debilitação do sistema imune, o que torna estas bactérias micro-organismos oportunistas (DOIG; RUHNKE; PALMER, 1980). A fase crônica da infecção está relacionada à presença das lesões inflamatórias, principalmente quando ocorre VVG (SANDERSON et al., 2000; GAMBARINI et al., 2009).

Ainda sobre o estado crônico da infecção, Doig et al. (1979) relataram que, conforme a infecção se torna crônica, os sinais clínicos podem variar desde ausência de descarga purulenta até um declínio gradual dos sinais inflamatórios, relacionados tanto com a hiperemia local quanto às formações granulares. Sobre isso, sabe-se que *Ureaplasma diversum* pode causar apoptose nas células infectadas nas primeiras horas (fase aguda), no entanto, com o passar do tempo (72h), há uma redução de apoptose, podendo isso estar relacionado ao padrão molecular associado aos diferentes patógenos bacterianos (AMORIM et al., 2014). Estas diferenças podem estar associadas aos diferentes sorotipos de *U. diversum*, sorotipo A, B e C, destacando-se que há predominância dos sorotipos B e C nos machos e B em fêmeas (Le GRAND et al., 1995).

2.4 Diagnóstico

Os materiais biológicos de eleição para detecção de Mollicutes em rebanho bovino são o muco vaginal ou cervical (COTTEW, 1970; LANGFORD, 1975; NASCIMENTO et al., 2005; GAMBARINI et al., 2009), muco prepucial, sêmen fresco ou congelado (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004) e leite (MAUNSELL et al., 2011).

O cultivo de micoplasmas é difícil, principalmente quando cuidados não são realizados na obtenção da amostra clínica, no método da coleta, nas condições de transporte ou até mesmo quando os meios nutrientes não atendem às exigências de sobrevivência e multiplicação destes agentes fora do ambiente biológico (BUZINHANI; METIFFOGO; TIMENETSKY, 2007).

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pelo cultivo e identificação dos agentes. É um procedimento que requer cuidados e meios específicos: meio Hayflick para gênero *Mycoplasma* spp. (WHITFORD et al. 1994) e meio UB para gênero *Ureaplasma* spp. (RAZIN; TULLY, 1996); com as provas bioquímicas adequadas para a realização da diferenciação das colônias (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004).

Para a identificação das espécies, alguns procedimentos bioquímicos são realizados, tais como: hidrólise da ureia; fermentação da glicose; hidrólise da arginina; atividade de fosfatase; a formação de filmes e manchas; redução do tetrazolio; liquefação de soro coagulado; e a hidrólise da caseína (WHITFORD, 1994; PRETTO et al., 2001). Algumas características bioquímicas são observadas apenas em *Mycoplasma* spp., que descarboxila a

arginina, e *U. diversum*, que é reconhecido especificamente pela atividade de hidrolisar a ureia (POVEDA, 1995), o que caracteriza a sua nomenclatura (SANDERSON et al., 2000). A prova de urease é utilizada na identificação de *Ureaplasma* spp. (RAZIN; TULLY, 1996).

A detecção molecular pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como descrito por Kobayashi et al., (1998), é utilizada com o objetivo de pesquisar Mollicutes em rebanho bovino. Outras variações da técnica são utilizadas, como *Nested-PCR* (CARDOSO et al., 2000); PCR convencional (ARGUE; CHOUSALKAR; CHENOWETH, 2013); PCR multiplex (TRAMUTA et al., 2011); PCR quantitativa (MARQUES et al., 2013) e RT-PCR (AMORIM et al., 2014), que possibilita ensaios mais rápidos e mais confiáveis (MACKAY, 2004).

As técnicas moleculares têm sido preferidas para o diagnóstico em virtude das dificuldades nos procedimentos de cultivo, isolamento e identificação específicos do agente em questão (BUZINHANI; METIFFOGO; TIMENETSKY, 2007).

2.5 Profilaxia

Na micoplasmose bovina, tanto a vacinação quanto o tratamento com antibiótico demonstram poucos resultados; dessa forma, a separação adequada dos animais e procedimentos sanitários rígidos tornam-se as melhores medidas para prevenir a transmissão do agente (NICHOLAS; AYLING, 2003). Manter os animais em boas condições ambientais e corporais torna-se, também, uma boa ferramenta de controle da micoplasmose bovina (TILLARD et al., 2008).

Medidas sanitárias envolvendo o manejo reprodutivo do rebanho podem minimizar os riscos da infecção por Mollicutes, como o rígido controle de trânsito de animais na fazenda, monitoramento semestral de enfermidades (FAVA et al., 2003) e o uso de sêmen de procedência com atestado sanitário negativo (SHIN et al., 1988); são os requisitos da instrução normativa – IN, de n° 53/2006, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que trata do regulamento para registro e fiscalização de centro de coleta e processamento de sêmens (CCPS) bovino, bubalino, caprino e ovino (MAPA, 2006).

Os fômites devem ser adequadamente higienizados (GIVENS; MARLEY, 2008) com o uso de agentes desinfetantes (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999),

como, por exemplo, aqueles à base de soluções de formalina ou de ácido paracético, que destroem micoplasmas em curto período; além disso, podem ser usados os iodóforos que também são recomendados para a imersão de tetos e os à base de hipocloreto, utilizados na rotina de propriedades leiteiras, porém estes podem se tornar inadequados, uma vez que são necessárias concentrações relativamente elevadas e longos períodos de exposição (PFÜTZNER; SACHSE, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Realizar um estudo epidemiológico da infecção por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* em bovinos na microrregião do Vale do Ipanema, estado de Pernambuco.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a ocorrência da infecção por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* em bovinos procedentes da microrregião do Vale do Ipanema;
- Identificar os fatores de risco associados à infecção por Mollicutes em bovinos procedentes da microrregião do Vale do Ipanema.

CAPÍTULO I

Occurrence of *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* in cattle in the state of Pernambuco

Submitted to journal: Tropical Animal Health and Production

ABSTRACT

The objective of this study was to conduct an epidemiological investigation of *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* infections in cattle in the microregion of the Ipanema Valley, state of Pernambuco. Vaginal swabs were collected from 355 cows of reproductive age and were submitted to polymerase chain reaction (PCR) and microbiological isolation. An investigative questionnaire was used to analyze the risk factors associated with Mollicutes infection. According to PCR, 9.29% (33/355) of cattle were positive for *Mycoplasma bovis* and 21.69% (77/355) for *Ureaplasma diversum*; coinfection was observed in 2.81% (10/355). According to isolation, 81.81% (27/33) *Mycoplasma* growth was reported in the Hayflick medium and 24.67% (19/77) *Ureaplasma diversum* growth in the UB medium. The risk factors for Mollicutes infection were semi-intensive breeding system (OR = 4.6), pasture rent (OR = 3.6), nonisolation of animals with reproductive disorders (OR = 3.2), and natural mounting and artificial insemination (OR = 3.5). There was a significant association between Mollicutes infection and abortions in the first gestational third ($p = 0.001$). This is the first record of *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* infection in cattle herds in the semiarid region of the state of Pernambuco, Brazil. Preventive measures directed to the identified risk factors can decrease the occurrence of Mollicutes in these cattle herds.

KEYWORDS: Ipanema Valley, isolation, Mollicutes, risk factors.

INTRODUCTION

Animal mycoplasmosis is caused by prokaryotes without a cell wall, which belong to the Mollicutes class. *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* are associated with reproductive problems in cattle (Sanderson et al., 2000; Ghanem et al., 2013), but other

species of *Mycoplasma*, such as *Mycoplasma canadense*, are also identified in reproductive disorders (Lysnyansky et al., 2009).

Genital infections caused in females by *Mycoplasma bovigenitalium* are characterized by granular vulvovaginitis with mucopurulent vaginal flush, which may cause infertility, and in some cases, necrotizing endometritis (Cardoso and Vasconcellos, 2004). On the other hand, *Ureaplasma diversum* infection is associated with abortion, estrus recurrence, granular vulvovaginitis and infertility in infected herds (Miller et al., 1994).

Previous studies indicate the occurrence of Mollicutes infection associated with reproductive problems in cattle in countries such as Australia (Argue et al., 2013), Israel (Lysnyansky et al., 2009), and the United States of America (Sanderson et al., 2000) In Brazil, this is reported in the states of Paraíba (Santos et al., 2013), Alagoas (Oliveira Filho et al., 2005), São Paulo (Buzinhani et al., 2007), and Mato Grosso (Gaeti et al., 2014).

The risk factors associated with Mollicutes infection in cattle herds are related to stressors in the diet, such as high milk production, excessive movement of animals (exhibition and trade cattle) (Aebi et al., 2015), and heifers and cows with fewer gestations (Léon et al., 1995).

Considering that Mollicute infection in cattle was already diagnosed in herds in the Northeast region and that there is commercial movement of these animals among the Brazilian states, this study aimed to conduct an epidemiological investigation of *Mycoplasma bovigenitalium* and *Ureaplasma diversum* infections in cattle in the microregion of the Ipanema Valley, state of Pernambuco.

MATERIALS AND METHODS

The present study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal Rural University of Pernambuco, under license number 042/2015 (ANEX 1). All authors gave their consent for inclusion in this study.

The herds studied came from 18 properties distributed among the six municipalities of the Ipanema Valley microregion in the Pernambuco semiarid region: Águas Belas (n = 3), Buíque (n = 3), Venturosa (n = 3), Pedra (n = 3), Itaíba (n = 3), and Tupanatinga (n = 3) (Figure

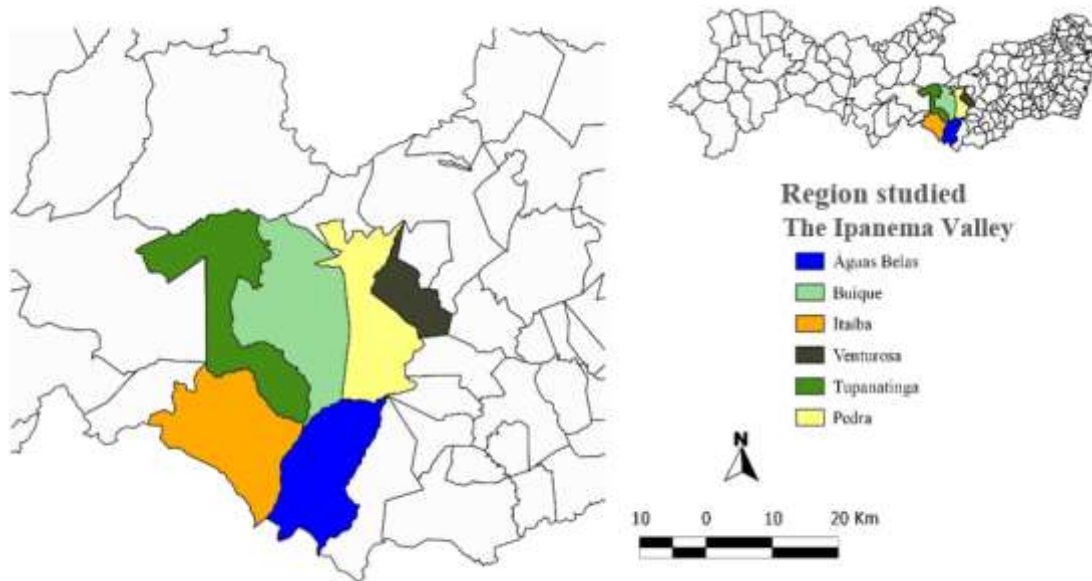


Fig. 1 - Area of study, microregion of the Ipanema Valley - Pernambuco-PE, Brazil.

A total of 336,221 cattle (Ibge, 2007) and an expected prevalence of 65.6% were considered (Santos et al., 2013). At a significance level of $p < 0.05$, these parameters provided a minimum sample size (n) of 355 dairy cattle (Thrusfield, 2013). The number of animals evaluated in each herd was calculated using the Astudillo formula (1979), based on the

aforementioned values. The choice of properties was performed for convenience and the inclusion criterion was females of reproductive age.

For the study of risk factors, a standardized questionnaire containing information on hygienic-sanitary management and reproductive history was applied to each herd (APPENDIX 3). The data were annotated in an identification card of the properties and control of the animals sampled (APPENDIX 1), after the owner signed a declaration of free consent (APPENDIX 2).

For biological material gathering, after previous containment, the hygiene preparation of the vulva with 70% alcohol was performed, and samples of vulvovaginal mucus were collected using sterilized swabs rubbed on the vagina internal walls and transported in 3 mL of phosphate buffered saline (pH 7.2) (Fichel et al., 2005)

The biological material was placed in an isothermal box containing recyclable ice and sent to the laboratory for processing. The samples were aliquoted by 600 µL volume and subjected to DNA extraction with a commercial kit from Promega® (Wizard Genomic DNA Purification Kit Catalog A1125). The separated aliquots for microbiological isolation were stored in 2:1 ratio glycerol in microtubes, vortex homogenized and stored in a freezer at -16 °C until use.

The analyzed DNA samples were submitted to the multiplex polymerase chain reaction (PCR) technique for *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* species identification according to the thermal profile and oligonucleotides described by Tramuta et al., (2011), The following primers were used for PCR: *Mycoplasma bovis* (16S rRNA), 5' GTT TGA TCC TGG CTC AGG AT 3' and 5' AAG GTA CAT TCA ATA TAG TGG 3'; *Ureaplasma diversum* (16S rRNA), 5' GTT TGA TCC TGG CTC AGG AT 3' and 5' CTC ATA AGC GAG CC GAC ATT 3'. The reaction mixtures comprised a 25 µL volume containing 5 µL DNA template, 30 pmol of each oligonucleotide and 6.25 µL GoTaq®Green

Master Mix (Promega® Corporation, Madison, WI, USA, Ref. M7122), and ultrapure water. The positive control in the reaction mixtures for *Ureaplasma diversum* was the strain BrPB18 and *Mycoplasma bovis* strain (PG11, ATCC). As a negative control, PCR water was used. For electrophoresis, 1.5% agarose gel (100 V/60 min), 9 µL PCR reaction mixtures plus 0.3 µL bluegreen dye, and 5 µL of the molecular weight marker were used. To confirm the species studied, sequencing of some PCR positive samples was performed.

The PCR positive samples were submitted to microbiological isolation for *Mycoplasma* in modified Hayflick medium broth and board, as described in Whitford et al. (1994), and in UB specific medium broth and board for *Ureaplasma diversum* growth, according to Razin and Tully (1996). For reading of the samples, a stereoscopic microscope was used and considered positive at isolation for the samples presenting fried-egg-shaped colonies, which characterize *Mycoplasma* and the small, dark brown granular colonies, which characterize *Ureaplasma diversum*. All samples were monitored for 21 days.

For the infection-associated risk factor analysis, a variables of interest univariate analysis was performed using the Pearson chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test, followed by a logistic regression analysis, which considered the PCR result for Mollicutes as the dependent variable. The independent variables considered in the model were those with a statistical significance lower than 0.20. This probability was stipulated for possible event risk factors that were not excluded from the analysis (Hosmer and Lemeshow, 1989). EpiInfo™7 was used to perform the statistical calculations and the significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

From the 355 samples analyzed using PCR, 9.3% (33/355) were positive for *Mycoplasma bovis* and 21.7% (77/355) for *Ureaplasma diversum*; coinfection was present in 2.8% (10/355). The positive result distribution is shown in Table 1.

Mycoplasma growth in the Hayflick medium was 81.8% (27/33) and *Ureaplasma diversum* growth in the UB medium was 24.7% (19/77).

Table 1. Occurrence of infection by Mollicutes in dairy cows in the Ipanema Valley microregion, Pernambuco

Property	N	Positive	<i>M. bovis</i>	<i>U. diversum</i>	Coinfection
A	35	23 (65,7%)	7	13	3
B	33	24 (72,7%)	7	15	2
C	58	23 (39,7%)	4	17	2
D	8	5 (62,5%)	-	4	1
E	20	1 (5,0%)	-	1	-
F	20	2 (10,0%)	-	2	-
G	13	1 (7,7%)	1	-	-
H	8	6 (75,0%)	-	6	-
I	14	5 (35,7%)	-	4	1
J	14	3 (21,4%)	1	1	1
K	8	0 (0,0%)	-	-	-
L	11	0 (0,0%)	-	-	-
M	13	2 (15,4%)	1	1	-
N	17	2 (11,7%)	-	2	-
O	28	1 (3,6%)	1	-	-
P	17	0 (0,0%)	-	-	-
Q	12	1 (8,3%)	-	1	-
R	26	1 (3,8%)	1	-	-
TOTAL	355	100 (28,2%)	23	67	10

N - number of samples gathered at the property.

The risk factors associated with Mollicutes infection in the studied herds were semi-intensive breeding system (OR = 4.6, p = 0.040), (OR = 3.2, p < 0.001), pasture rental performance (OR = 3.6, p < 0.001), and simultaneous use of artificial insemination and natural mounting in reproductive management (OR = 3.5, p < 0.001) (Table 2).

Table 2. Analysis of risk factors associated with Mollicutes infection.

Variables	N	PCR Positive	Valor P	Logistic regression OR (I.C. 95%)	Valor P
Criation system					
Semi-intensive	331	98 (29.6%)	0.031 ^{(A)*}	4.6 (1.0-20.0)	0.040*
Extensive	24	2 (8.3%)			
Animal isolation					
Yes	194	34 (17.5%)	<0.001 ^{(B)*}		
No	161	66 (41.0%)		3.2 (2.0-5.3)	<0.001*
Pasture rent					
Yes	209	79 (37.8%)	<0.001 ^{(B)*}	3.6 (2.1-6.2)	<0.001*
No	146	21 (14.4%)			
Fate of sick animals					
Discard	184	44 (23.9%)	0.064 ^(A)		
Remains	171	56 (32.7%)		1.5 (0.9-2.4)	0.065
Reproductive management					
Natural mount	243	54 (22.2%)	<0.001 ^{(A)*}	-	
Artificial insemination	66	23 (34.8%)		1.8 (1.0-3.3)	0.037*
Both	46	23 (50.0%)		3.5 (1.8-6.7)	<0.001*

^(A) Fisher's Exact Test; ^(B) χ^2 Test; ¹ different database (N = 296); N - Total Number of Samples; OR - Odds Ratio; I.C. - Confidence Interval; *Significant association at the <0.05 level.

When analyzing the reproductive history of the herds studied, a significant association was observed between the gestational stage in which abortion occurred ($p = 0.001$) and Mollicutes infection (Table 3). In addition, 85 cows had a history of granular vulvovaginitis, 3.5% (3/85) were positive for *Mycoplasma bovis* and 5.9% (5/85) were positive for *Ureaplasma diversum*.

Table 3. Reproductive history associated with Mollicutes infection.

Variable	N	PCR Positive	Valor P
Animals with mastitis			
Yes	329	94 (28.6%)	0.549 ^(A)
No	26	6 (23.1%)	
History of placenta retention			
Yes	322	92 (28.6%)	0.599 ^(A)
No	33	8 (24.2%)	
Repetition history of estrus			
Yes	343	99 (28.9%)	0.190 ^(A)
No	12	1 (8.3%)	
Gestation third in which abortion occurred¹			
1/3	55	24 (43.6%)	0.001 ^{(A)*}
2/3	149	29 (19.5%)	
3/3	73	17 (23.3%)	

^(A) χ^2 Test; N - Total Number of Samples; ¹ different database (N = 277); *

Significant association at the $p < 0.05$ level.

DISCUSSION

This is the first record of *Mycoplasma bovigenitalium* and *Ureaplasma diversum* infections in cattle herds in the semiarid region of the state of Pernambuco, Brazil. Mollicutes identification in the reproductive tract of bovine females was reported in Brazil (Fichel et al., 2005; Buzinhani et al., 2007; Marques et al., 2013) and other countries (Sanderson et al., 2000; Lysnyansky et al., 2009; Smith et al., 2012 ; Argue et al., 2013; Ghanem et al., 2013).

An occurrence of 9.3% for *Mycoplasma bovigenitalium* infection was observed in this study. These values are close to those found in Ghanem et al.'s (2013) study, in Japan, which

found 7.4% occurrence of *Mycoplasma bovis* in cervicovaginal mucus samples from postpartum period Hollander cows.

The low occurrence of Mollicutes infection may be related to the low amount of DNA present in the biological material. Husted (2003) reported that the low amount of DNA in the studied samples may result in a low frequency of positive samples. Furthermore, the animals did not present suggestive clinical signs during the gathering, unlike the studies conducted by Santos et al., (2013, 2015), which investigated the occurrence of Mollicutes in herds with reproductive disorders.

In the present study, *Ureaplasma diversum* was detected in 21.7% (77/355) of the samples. The higher occurrence of *Ureaplasma diversum* infection in relation to *Mycoplasma bovis* may be due to the agent's colonization characteristic, given that *Ureaplasma diversum* remains longer in the organism of asymptomatic animals depending on the urea concentrations in urogenital tract excreta, which is an important nutrient for this bacterium (Sanderson et al., 2000)

On seven properties ("A" "B," "C," "D," "H," "I," and "J"), the occurrence of positive animals was greater for the agents in question. In these properties, milk production was higher, which corroborates the Gábor et al., (2008) report of Mollicutes occurrence in a herd with higher milk production. Moreover, the use of natural mounting and/or artificial insemination as reproductive management may have contributed to this agent's spread by the herd. According to (Nicholas and Ayling, 2003), contaminated semen is an important transmission route in bovine species.

It was observed that 81.8% (27/33) of the PCR-positive samples grew *Mycoplasma* in the specific medium. This percentage is higher than that reported by other authors in Brazil (Fichel et al., 2005; Buzinhani et al., 2007), who also isolated only *Mycoplasma*. When comparing the results of this study with those of other studies that isolated *Mycoplasma*

species in cattle in other countries (Petit et al., 2008; Lysnyansky et al., 2009), the result was superior. In addition, the isolation of the genus is more practical than that of different *Mycoplasma* species. (Nagatomo et al., 2001) inoculated several species of *Mycoplasma* in liquid medium and found different isolation rates compared to the culture media and a sensitivity to temperature variations.

The isolation rate of *Ureaplasma diversum* was reported to be 24.67% (19/77). In other studies, higher results have been described (Buzinhani et al., 2007; Petit et al., 2008; Marques et al., 2013); however, in the aforementioned research, the isolation was performed from herds with clinical signs of mycoplasmosis.

The isolation rate of *Ureaplasma diversum* was lower than that of *Mycoplasma*. It is probable that the presence of dead cells (*Ureaplasma diversum*) in the samples accounted for the lower rate of growth in the specific medium.

Natural mounting and artificial insemination were identified as risk factors associated with Mollicutes infection in the present study. Some authors confirm the presence of *Ureaplasma diversum* (Rose and Scott, 1994; Hobson et al., 2013) and *Mycoplasma bovis* (Cardoso and Vasconcellos, 2004) in semen and indicate the importance of this transmission route for the agent's spread in cattle (Nicholas and Ayling, 2003, Petit et al., 2008).

Animals submitted to the semi-intensive breeding system were 4.6 times more likely to be infected by Mollicutes than those submitted to the extensive system. Santos et al. (2013) detected Mollicutes (65.6% - 21/32) and *Ureaplasma diversum* (15.6% - 5/32) in a reproductive disease outbreak where animals were reared in a semi-intensive system. In this system the transmission of the agent by direct contact is favored (Gambarini et al., 2009), mainly at the time of milking, because the cows have the habit of smelling and licking the external genitalia of each other, which facilitates the agent's dissemination (Rocha, 2009).

In properties with pasture rental practice, the animals are more likely to become infected by Mollicutes (OR = 3.6), which is also true for properties where animals with reproductive problems are not isolated (OR = 3.2). Thus, both the pasture rental practice and not isolating animals with reproductive disorders can lead to the contact of cattle with secretions and excretions from infected animals (Nicholas and Ayling, 2003; Daniel Givens and Marley, 2008).

There was an association between abortion in the first gestational third ($p = 0.001$) and Mollicutes infection, and history of abortion was observed in 45.6% of the positive cows. Petit et al. (2008) indicated that the detection of *Mycoplasma bovis* is greater in animals with a history of abortion. Another study implicated the occurrence of abortion in the first (25%) and third (75%) gestation thirds. Abortion caused by *Ureaplasma diversum* is related to placentitis and fetal pneumonia occurring mainly in the third gestational third (Nascimento and Santos, 2003). Given that there are divergences between the studies related to the timing of abortion, it is suggested that experimental or observational studies be conducted with the purpose of establishing the time of pregnancy at which the cows have a higher risk of aborting when infected with Mollicutes.

It was found that 9.41% (8/85) of the positive cows (3/8 for *Mycoplasma bovis* and 5/8 for *Ureaplasma diversum*) showed signs of granular vulvovaginitis during the gathering of biological material. Gambarini et al. (2009) and Cardoso et al. (1997) reported that granular vulvovaginitis may be associated with the presence of *Ureaplasma diversum*. Oliveira-Filho et al. (2005) demonstrated that the presence of *Ureaplasma diversum* is associated with the occurrence of granular vulvovaginitis syndrome, and is independent of the lesion degree observed in the vulvovaginal mucosa.

Some animals had granules in the vulva and were negative for Mollicutes, representing 90.5% (77/85). The clinical condition of VVG is not pathognomonic for

Mollicutes infection, as other agents may cause these lesions, such as BoHV-1 (Kahrs, 1977; Roizman et al., 1995).

CONCLUSION

This is the first record of the occurrence of Mollicutes infection in cattle herds in the semiarid region of Pernambuco. Preventive measures directed at these identified risk factors may contribute to a decrease in the occurrence of Mollicutes in cattle herds.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Aebi, M., van den Borne, B.H.P., Raemy, A., Steiner, A., Pilo, P., Bodmer, M., 2015. *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 57, 10.
- Argue, B., Chousalkar, K., Chenoweth, P., 2013. Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population. *Australian Veterinary Journal*. 91, 99–101.
- Astudillo, V. M., 1979. Encuestas por muestro para estudios epidemiológicos em populações animais. Rio de Janeiro: Organização Panamericana de la Salud –Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 60.
- Buzinhani, M., Metiffogo, E., Timenetsky, J., 2007. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59, 1368–1375.
- Cardoso, M. V., Vasconcellos, S. A., 2004. Importância das micoplasmoses na fertilidade de touros. *Arquivos do Instituto Biológico*, 71, 2, 257–265.
- Cardoso, M. V., Grasso, L., Stefano, E., Okuda, L. H., & Cunha, R. A. F., 1997. Isolamento de *Ureaplasma diversum* e *Mycoplasma* spp. em casos de Vulvovagite Granular Bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 21, 172-173.
- Daniel Givens, M., Marley, M.S.D., 2008. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology* 70, 270–285.
- Fichel, G., Helena, F., Angelis, D.F.D., 2005. Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33, 195–199.
- Gábor, G., Tóth, F., Ózsvári, L., Abonyi-Tóth, Z., Sasser, R.G., 2008. Factors influencing pregnancy rate and late embryonic loss in dairy cattle. *Reproduction in Domestic*

Animals. 43, 53–58.

- Gaeti, J.G.L.N., Lana, M.V.C., Silva, G.S., Lerner, L., de Campos, C.G., Haruni, F., Colodel, E.M., Costa, E.F., Corbellini, L.G., Nakazato, L., Pescador, C.A., 2014. *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* 46, 1059–1063.
- Gambarini, M.L., Kunz, T.L., Filho, B.D.O., Porto, R.N.G., Oliveira, C.M.G., Brito, W.M.E.D., Viu, M.A.O., 2009. Granular Vulvovaginitis Syndrome in Nelore pubertal and post pubertal replacement heifers under tropical conditions: Role of *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma diversum* and BHV-1. *Tropical Animal Health and Production*. 41, 1421–1426.
- Ghanem, M.E., Higuchi, H., Tezuka, E., Ito, H., Devkota, B., Izaike, Y., Osawa, T., 2013. *Mycoplasma* infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis. *Theriogenology* 79, 180–185.
- Hobson, N., Chousalkar, K.K., Chenoweth, P.J., 2013. *Ureaplasma diversum* in bull semen in Australia: Its detection and potential effects. *Australian Veterinary Journal*. 91, 469–473.
- Hosmer, D. W., & Lemeshow, S., 1987. *Applied logistic regression*. 2th ed. New York, NY: Wiley–Interscience Publication, 392.
- Husted, J. R., 2003. Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis. (Master's thesis, Texas A&M University. Texas A&M University).
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2007. Disponível em >http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201402_publ_completa.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2016.
- Rocha J. M. N., 2009. Micoplasmose Em Bovinos De Aptidão Leiteira: Fatores predisponentes para a ocorrência e manifestação da síndrome da vulvovaginite granular (Tese em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás).
- Kahrs, R. F., 1977. Infectious bovine rhinotracheitis: a review and update. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 171, 1055-1064.
- Léon, B.A., Campos, E., Bolaños, H., & Caballero, M., 1995. Risk factors for *Ureaplasma diversum* infection in cattle in a tropical environment. *Revista de Biología Tropical*., San Jose, 43, 21-25.
- Lysnyansky, I., Brenner, J., Alpert, N., Benjamin, A., Bernstein, M., Elad, D., Blum, S., Friedgut, O., Rotenberg, D., 2009. Identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. *Veterinary Record*. 165, 319–322.
- Marques, L.M., Amorim, A.T., Martins, H.B., Rezende, I.S., Barbosa, M.S., Lobão, T.N., Campos, G.B., Timenetsky, J., 2013. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum*. *Veterinary Microbiology*. 167, 670–674.

- Miller, R., Chelmonska-Soyta, A., Smits, B., Foster, R., Rosendal, S., 1994. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*. 10, 479–490.
- Nagatomo, H., Takegahara, Y., Sonoda, T., Yamaguchi, A., Uemura, R., Hagiwara, S., Sueyoshi, M., 2001. Comparative studies of the persistence of animal micoplasmas under different environmental conditions. *Veterinary Microbiology*. 82, 223–232.
- Nascimento, E. F. & Santos, R. L., 2003. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2º edição, 70-89.
- Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D., 2003. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Veterinary Science*. 74, 105–112.
- Oliveira Filho, B.D., Porto, R.N.G., Gambarine, M.L., Kunz, T.L., Ferraz, H.T., Viu, M.A.O., Lopes, D., Souza, A.P.F., (2005). Isolamento do *Ureaplasma diversum* em muco vulvovaginal de vacas leiteiras repetidoras de estro no estado de Alagoas – Brasil. *Archives of Veterinary Science*. 10, 151–156.
- Petit, T., Spersger, J., Aurich, J., Rosengarten, R., (2008). Prevalence of Chlamydiaceae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*. 127, 325–333.
- Razin, S., & Tully, J. G., 1996. *Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmaology*. ed. 2. California: Academic Press, 463.
- Roizman, B., Desrosiers, R. C., Fleckenstein, B., Lopez, C., Minson, A. C., & Studdert, M. J., 1995. Family herpesviridae. *Archives of Virology*, 140, 114-127.
- Rose, B. I., & Scott, B., 1994. Sperm motility, morphology, hyperactivation, and ionophore-induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasmas. *Fertility and Sterility*. 61, 341-348.
- Sanderson, M.W., Chenoweth, P.J., Yeary, T., Nietfeld, J.C., (2000). Prevalence and reproductive effects of *Ureaplasma diversum* in beef replacement heifers and the relationship to blood urea nitrogen level. *Theriogenology* 54, 401–408.
- Santos, S.B., Pinheiro Júnior, J.W., Oliveira, A.A.F., Mota, A. da R., De Oliveira, J.M.B., Veras, G.A., Do Nascimento, E.R., Mota, R.A., 2013. Ocorrência de Mollicutes e *Ureaplasma* spp. em surto de doença reprodutiva em rebanho bovino no estado da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33, 315–318.
- Santos, S.B., Pinheiro-Júnior, J.W., Mota, A.R., Santos, A.S., Alves, B.H.L.S., Oliveira, J.M.B., Silva, L.B.G., Mota, R.A., 2015. Recovery of Mollicutes from the reproductive tract of dairy cattle in the state of Pernambuco, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 35, 491–496.
- Smith, A., Chousalkar, K.K., Chenoweth, P.C., 2012. Polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma diversum* from urogenital swabs in cattle in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 90, 275–276.

Thursfield, M., 2013. *Veterinary Epidemiology*. Wiley-Blackwell, 610.

Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Goria, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Nebbia, P., Rosati, S., 2011. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23, 657–64.

Whitford, H. W., Rosenbusch, R. F., & Lauerma, L. H., 1994. *Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*. Ames: Iowa State University Press, 173.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A micoplasmose bovina é uma infecção que acomete bovinos de exploração leiteira na microrregião do Vale do Ipanema/PE. A partir deste estudo, pode-se dizer que é necessária a realização de novas pesquisas que estimem as perdas econômicas ocasionadas pela infecção das bactérias da classe Mollicutes, associadas a problemas reprodutivos.

Diante dos resultados obtidos, os fatores de risco identificados são importantes para direcionar as medidas preventivas que visem o controle da micoplasmose no rebanho, bem como em suas instalações, além de alertar para um manejo reprodutivo que envolva melhor procedência de sêmen para realização de inseminação artificial e/ou transferência de embriões, a fim de diminuir a ocorrência da micoplasmose bovina e, conseqüentemente, seus impactos na produção de leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, M.; BORNE, B. H.; RAEMY, A.; STEINER, A.; PILO, P.; BODMER, M. (2015). *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: a clinical investigation. *Acta vet Scand*, 57(10):1-11.
- AL-MOMANI, W.; NICHOLAS, R. A. J.; ABO-SHEHADA, M. N. (2008). Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. *Prev Vet Med*, 83(1):1–10.
- AMORIM, A.; MARQUES, L. M.; SANTOS, A. M. O. G.; MARTINS, H. B.; BARBOSA, M. S.; REZENDE, I. S.; ANDRADE, E. F.; CAMPOS, G. B.; LOBÃO, T. N.; CORTEZ, B. A.; MONEZI, T. A.; MACHADO-SANTELLI, G. M.; TIMENETSKY, J. (2014). Apoptosis in HEp-2 cells infected with *Ureaplasma diversum*. *Biol Res*, 47(1):38.
- ARGUE, B.; CHOUSALKAR, K.; CHENOWETH, P. (2013). Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population. *Aust Vet J*, 91(3):99–101.
- AZEVEDO, J. B.; SILVA, G. S., ROCHA, P. S., PITCHENIN, L. C., DUTRA, V., NAKAZATO, L.; OLIVEIRA, A. C. S.; PESCADOR, C. A. (2016). Presence of *Ureaplasma diversum* in the genital tracts of female dairy cattle in Mato Grosso State, Brazil. *Anim Health Res Rev*, 1-6.
- BIELANSKI, A.; DEVENISH, J.; PHIPPS-TODD, B. (2000). Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis genitalium* in semen on fertilization and association with in vitro produced morula and blastocyst stage embryos. *Theriogenology*, 53(6):1213–1223.
- BLUM, S.; MAZUZ, M.; BRENNER, J.; FRIEDGUT, O.; KOREN, O.; GOSHEN, T.; ELAD, D. (2008). Effects of bovine necrotic vulvovaginitis on productivity in a dairy herd in Israel. *Vet J*, 176(2):245–247.
- BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. (2007). Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. *Arq Bras Med Vet Zoot*, 59(6):1368–1375.
- CARDOSO, M V.; TEIXEIRA, S.R.; MIYASHIRO, S. (2006). Estudo comparativo entre técnicas de isolamento o 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. *Arq Inst Biol*, 73(1):33–40.
- CARDOSO, M. V.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L. M. P.; TEIXEIRA, S. R.; GENOVEZ, M. É. (2000). *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. *Anim Reprod Sci*, 63(4):137–143.
- CARDOSO, M. V.; VASCONCELLOS, S. A. (2004). Impotência das micoplasmoses na fertilidade de touros. *Arq Inst Biol*, 71(2):257–265.
- CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. (1999). Interactions between *Mycoplasma* Lipoproteins and the Host Immune System. *Trends Microbiol*, 7(12): 493–9.

- CHELMONSKA-SOYTA, A.; MILLER, R. B.; RUHNKE, L.; ROSENDAL, S. (1994). Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. *Can J Vet Res*, 58(4):275–280.
- COTTEW, G. S. (1970). *Mycoplasmas* Isolated from cattle in Australia. *Aust Vet J*, 46(8):378–381.
- DEL FAVA, C.; ARCARO, J. R. P.; POZZI, C. R.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E. M.; STEFANO E.; OKUDA L.H.; VASCONCELLOS, S. A. (2003). Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. *Arq Inst Biol*, 70(1):25–33.
- DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L.; MACKAY, A. L.; PALMER, N. C. (1979). Bovine granular vulvitis associated with *Ureaplasma* infection. *Can Vet J*, 20(4):89–94.
- DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L.; PALMER, N. C. (1980). Experimental bovine genital ureaplasmosis. I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. *Can J Comp Med*, 44(3):252–8.
- EDWARD, D. G. F. F.; FREUNDT E. A. (1967). Proposal for mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. *Inter J Syst Bact*, 17(3):267–268.
- FREUNDT, E. A. (1955). The classification of the pleuropneumonia group of organisms (Borrelomycetales). *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon*, 5(2):67–78.
- GAETI, J. G. L.; LANA, M. V.; SILVA, G. S.; LERNER, L.; CAMPOS, C. G.; HARUNI, F.; COLODEL, E. M.; COSTA, E. F.; CORBELLINI, L. G.; NAKAZATO, L.; PESCADOR, C. A. (2014). *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil. *Anim Health Res Rev*, 46(6):1059–1063.
- GAMBARINI, M. L.; KUNZ, T. L.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; PORTO, R. N. G.; OLIVEIRA, C. M. G.; BRITO, W. M. E. D.; VIU, M. A. O. (2009). Granular Vulvovaginitis Syndrome in Nelore pubertal and post pubertal replacement heifers under tropical conditions: Role of *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma diversum* and BHV-1. *Trop Anim Health Prod*, 41(7):1421–1426.
- GHANEM, M. E.; HIGUCHI, H.; TEZUKA, E.; ITO, H.; DEVKOTA, B.; IZAIKE, Y.; OSAWA, T. (2013). *Mycoplasma* infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis. *Theriogenology*, 79(1):180–185.
- GIVENS, M. D.; MARLEY, M. S. D. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, 70(3):270–285.
- GRÖHN, Y. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. (2000). Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci*, (60–61):605–614.
- HOWARD C.J., GOURLAY R.N. (1982) Proposal for a second species within the genus *Ureaplasma diversum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 32(4):446-452.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1014. Disponível em:<<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=510525&idtema=135&search=mato-grosso%7Clucas-do-rio-verde%7Cpecuaria-2013>> Acesso em: 10. Dez. 2016.

KOBAYASHI, H.; HIROSE, K.; WORARACH, A.; PAUGTES, P.; ITO, N., MOROZUMI, T.; YAMAMOTO, K. (1998). In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovis genitalium* by PCR. J Vet Med Sci, 60(12):1299–1303.

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.

KUHN M.J., HOPKINS S.M. (1983) A clinical review of bovine ureaplasmosis. Iowa State Univ Vet, 45(1).

LANGFORD, E. V. (1975). *Mycoplasma* species recovered from the reproductive tracts of western Canadian cows. Can J Comp Med, 39(2):133–8.

LEITE, T. E.; MORAES, J. C. F.; PIMENTEL, C. A. (2001). Productive and reproductive efficiency in dairy cows. Cienc Rural, 31(3):467–472.

LEÓN, B. A.; CAMPOS, E.; BOLANOS, H.; CABALLERO, M. (1995). Risk factors for *Ureaplasma diversum* infections in cattle of a tropical environment. Rev Biol Trop, 43(1–3):21–5.

Le GRAND, D.; POUMARAT, F.; MARTEL, J.L. (1995). Genital *Ureaplasma diversum* infection: investigations in cattle in France. Vet Res, 26 (1): 11-20.

LYSNYANSKY, I.; BRENNER, J.; ALPERT, N.; BENJAMIN, A.; BERNSTEIN, M.; ELAD, D.; BLUM, S.; FRIEDGUT, O.; ROTENBERG, D. (2009). Identification of *Mycoplasma bovis genitalium* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. Vet Rec, 165(11):319–322.

MACKAY, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect, 10(3):190–212.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2006. Instrução Normativa 53/2006. 04/10/2006. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=735332411>>. Acesso em: 20. dez. 2016.

MARQUES, L. M.; BUZINHANI, M.; LOPES NETO, R.; OLIVEIRA, R. C.; YAMAGUTI, M.; GUIMARÃES, A. M.; TIMENETSKY, J. (2009). Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine semen straws for artificial insemination. Vet Rec, 165(19):572–573.

MARQUES, L. M.; AMORIM, A. T.; MARTINS, H. B.; REZENDE, I. S.; BARBOSA, M. S.; LOBÃO, T. N.; CAMPOS, G. B.; TIMENETSKY, J. (2013). A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum*. *Vet Microbiol*, 167(3–4):670–674.

MARQUES, L. M.; GUIMARÃES, A. M.; MARTINS, H. B.; REZENDE, I. S.; BARBOSA, M. S.; CAMPOS, G. B.; NASCIMENTO, N. C.; SANTOS, A. P.; AMORIM, A. T.; SANTOS, V. M.; MESSICK, J. B. (2015). Genome Sequence of *Ureaplasma diversum* Strain ATCC 49782. *Genome Announc*, 3(2):9–10.

MASSUQUETO, S.; ALMEIDA, R.; SEGUI, M. S.; COELI, C.; PEREIRA, I. D. R.; GREBORI, A. (2007). Acompanhamento médico veterinário de vacas leiteiras de elevada produção, das raças holandesa preta e branca, vermelha e branca e pardo-suíça, recém-paridas. *Rev Acad, Curitiba*, 5(3):243–248.

MAUNSELL, F. P.; DONOVAN, G. A. (2009). *Mycoplasma bovis* Infections in young calves. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract*, 25(1):139–177.

MAUNSELL, F. P.; WOOLUMS, A. R.; FRANCOZ, D.; ROSENBUSCH, R. F.; STEP, D. L.; WILSON, D. J.; JANZEN, E. D. (2011). Consensus Statements *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle. *J Vet Intern Med*, 25:772–783.

MESEGUER, A.; ÁLVAREZ, A.; REJAS, T.; SÁNCHEZ, C.; PÉREZ-DÍ, J. C.; BAQUERO, F. (2003). *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen. *Infect Genet Evol*, 3:47–55.

MILLER, R. et al. (1994). *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 10:479–490.

MURRAY, R. D. (2012). Laboratory diagnosis of *Mycoplasma Ureaplasma* abortion in cattle. *Vet Rec*, 170(5):130–131.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. (2003). Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 89p.

NASCIMENTO, M. D. G. F.; FREITAS D'ANGELIS, F. H.; NASCIMENTO, E. R.; RESENDE, A. O. (2005). Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos *Mycoplasmas* involvement in cows with reproductive disorders. *Acta Scie Vet*, 33(2):195–199.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D.; WOODGER, N.; HOULIHAN, M. G. (2006). *Mycoplasmas* in adult cattle: Bugs worth bothering with? *Irish.Vet J*, 59(5):167–170.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D. (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci*, 74(2):105–112.

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. (2005). Isolamento do *Ureaplasma diversum* em muco vulvovaginal de vacas leiteiras repetidoras de estro no estado de Alagoas – Brasil. *Arch Vet Sci*, 10(2):151–156.

- PETIT, T.; SPERGSE, J.; AURICH, J.; ROSENGARTEN, R. (2008). Prevalence of Chlamydiaceae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. *Vet Microb*, 127(3–4):325–333.
- PFÜTZNER, H.; SACHSE, K. (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev Sci Tech*, 15(4):1477–1494.
- POVEDA, J. B. (1995). In *Mycoplasma Identification*. *Methods Mol Biol*, 104(3):69–78.
- POWELL, D. A.; CLYDE, W. A. (1975). Oposonin reversible resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to in vitro phagocytosis by alveolar macrophages. *Infect Immun*, 11(3):40–550.
- PRETTO, L. G.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E.; BUZIHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R (2001). Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesq Vet Bras*, 21(4):143–145.
- RAE, D. O.; CHENOWETH, P. J.; BROWN, M. B.; GENHO, P. C.; MOORE, S. A.; JACOBSEN, K. E. (1993). Reproductive performance of beef heifers: Effects of vulvovaginitis, *Ureaplasma diversum* and prebreeding antibiotic administration. *Theriogenology*, 40(3):497–508.
- RAJALA-SCHULTZ, P. J.; GRÖHN, Y. T. (1999). Culling of dairy cows. Part II. Effects of diseases and reproductive performance on culling in Finnish Ayrshire cows. *Prev Vet Med*, 41(4):279–294.
- RAZIN S.; TULLY J.G. (1996). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*. 2nd ed. Califórnia: Academic Press. 463p.
- ROTTEM, S. (2003). Interaction of *Mycoplasmas* with host cells. *Physiol Rev*, 83(2):417–432.
- RUHNKE, H. L.; DOIG, P. A.; MACKAY, A. L.; GAGNON, A.; KIERSTEAD, M. (1978). Isolation of *Ureaplasma* from bovine granular vulvitis. *Can J Comp Med*, 42(2):151–5.
- SACHSE, K.; PFÜTZNER, H.; HOTZEL, H.; DEMUTH, B.; HELLER, M.; BERTHOLD, E. (1993). Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Epiz.* 12:571-580
- SANDERSON, M. W.; CHENOWETH, P. J.; YEARY, T.; NIETFELD, J. C. (2000). Prevalence and reproductive effects of *Ureaplasma diversum* in beef replacement heifers and the relationship to blood urea nitrogen level. *Theriogenology*, 54(3):401–408.
- SANTOS, S. B.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; OLIVEIRA, A. A.; MOTA, A. D. R.; DE OLIVEIRA, J. M. B.; VERAS, G. A.; NASCIMENTO, E. R.; MOTA, R. A. (2013). Ocorrência de mollicutes e *Ureaplasma* spp. em surto de doença reprodutiva em rebanho bovino no estado da Paraíba. *Pesq Vet Bras*, 33(3):315–318.

SANTOS, S. B.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, A. R.; SANTOS, A. S.; ALVES, B. H.; OLIVEIRA, J.; SILVA, L. B.G.; MOTA, R. A. (2015). Recovery of Mollicutes from the reproductive tract of dairy cattle in the state of Pernambuco, Brazil. *Pesq Vet Bras*, 35(6):491–496.

SEBRAE 2010. Boletim Setorial do Agronegócio: Bovinocultura leiteira. Recife, agosto de 2010. Disponível em:< <https://pt.scribd.com/document/116954283/Boletim-Bovinocultura-Leiteira-SEBRAE>>. Acesso em: 12. Dez. 2016.

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 Ambient*, 2(1):69–85.

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.

SHIN, S. J.; LEIN, D. H.; PATTEN, V. H.; RUHNKE, H. L. (1988). A new antibiotic combination for frozen bovine semen: 1. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology*, 29(3), 577-591.

SMITH, A.; CHOUSALKAR, K. K.; CHENOWETH, P. C. (2012). Polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma diversum* from urogenital swabs in cattle in Australia. *Aust Vet J*, 90(7):275–276.

TILLARD, E.; HUMBLLOT, P.; FAYE, B.; LECOMTE, P.; DOHOO, I.; BOCQUIER, F. (2008). Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and sub-tropical conditions. *Theriogenology*, 69(4):443–457.

TRAMUTA, C.; LACERENZA, D.; ZOPPI, S.; GORIA, M.; DONDO, A.; FERROGLIO, E.; NEBBIA P.; ROSATI, S. (2011). Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *J Vet Diagn Invest*, 23(4):657–64.

VEREB, G.; SZÖLLÖSI, J.; MATKO, J.; NAGY, P.; FARKAS, T.; VIGH, L. M.; WALDMANN, T. A., DAMJANOVICH, S. (2003). Dynamic, yet structured : the cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 100(14):8053-8058.

VERSLYPE, N. I.; COELHO JÚNIOR, J. M.; WANDERLEY, R. A. (2016). Economia, agricultura e clima através de modelo digital do terreno na microrregião Vale do Ipanema *Economy , agriculture and climate through model digital terrain in micro region Vale of Ipanema. Geama*, 1(1):31-42.

WAITES, K.B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R.L. (2005). Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev*, Washington, 18(4):757-789.

WHITFORD H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. (1994). Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis. Ames: Iowa S.Univ. Press. 173p.

APÊNDICES

APÊNDICE 2

Termo de Declaração de Livre Consentimento



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

Eu, _____, Responsável pelos animais da espécie _____, Sexo _____, ESTOU CIENTE de que os animais de minha propriedade farão parte do projeto de pesquisa intitulado “Análise epidemiológica da infecção por *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* em Bovinos da microrregião do Vale do Ipanema, estado de Pernambuco”, em desenvolvimento no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, sob responsabilidade do Professor Dr. José Wilton Pinheiro Junior.

Outrossim, declaro ter sido cientificado de forma pormenorizada sobre os procedimentos que serão aplicados nesses animais.

Por estar plenamente de acordo, firmo o presente.

_____, _____ de _____ de _____

ASSINATURA

NOME:

RG nº:

APÊNDICE 3

QUESTIONÁRIO

DADOS DA PROPRIEDADE

Nº da propriedade: _____

Data:

____/____/____

Nome do proprietário: _____

Endereço: _____

E-mail: _____ Fone: () _____ - _____

Nome da microrregião: _____ Latitude: _____ Longitude: _____

MANEJO PRODUTIVO

1. Tipo de sistema de produção:

- a) intensivo
- b) semi-intensivo
- c) extensivo

2. Os animais são movimentados muitas vezes ao dia:

- a) Sim
- b) Não

3. Tipo de exploração:

- a) leite
- b) carne
- c) mista

4. Os animais de diferentes explorações têm contato entre si:

- a) sim
- b) não

5. Alimentação:

- a) concentrado
- b) silo
- c) pasto

6. Presença de fungos na silagem?

- a) sim
- b) não

7. Suplementação mineral:

- a) sim
- b) não

8. Fonte de água:

- a) corrente
- b) açude
- c) poço

9. Produção leiteira (litros/ano): _____

10. Número e vacas no rebanho: _____

11. Número de vacas em lactação: _____

12. Qual a procedência dos animais?

- a) rebanho autóctone
- b) exposição/leilão
- c) feira livre

13. Raças:

- a) Sim
- b) Não

14. O rebanho é fechado?

- a) Sim
- b) Não

15. Realiza quarentena?

- d) Sim
- e) Não

16. Isola os animais doentes?

- a) Sim
- b) Não

17. Possui assistência veterinária?

- a) sim
- b) não

MANEJO HIGIÊNICO E INSTALAÇÕES

18. Tipo de instalação:

- a) Piso ripado
- b) Chão batido
- c) Cimentado

19. Realiza limpeza das instalações

- a) Sim
- b) Não

20. Utiliza desinfetante?

- a) Sim
- b) Não

21. Tipo de ordenha:

- a) Manual
- b) Mecânica

22. Ventiladores/e ou circulação de ar nas instalações de ordenha:

- a) Sim
- b) Não

23. Desinfecção da teta pré ordenha:

- a) sim
- b) não

24. Desinfecção da teta pós ordenha:

- a) sim
- b) não

25. Realiza linha de ordenha?

- a) sim
- b) não

26. Mudanças no sistema de ordenha nos últimos 3 meses?

- a) sim
- b) não

27. Faz aluguel de pastagem?

- a) sim
- b) não

28. Há superlotação /todos podem deitar-se ao mesmo tempo?

- a) sim
- b) não

29. Há separação das vacas de lactação das que não estão em lactação:

- a) sim
- b) não

MANEJO REPRODUTIVO

30. As fêmeas apresentam problemas reprodutivos?

- a) Sim
- b) Não

31. Quais?

- a) aborto
- b) ret. placenta
- c) infertilidade.
- d) VVG
- e) rep. de cio
- f) crias fracas
- g) natimorto
- h) ↓ gestações
- i) prematuros

32. Destino desses animais:

- a) abate
- b) feiras/venda
- c) permanecem no rebanho

33. Utiliza piquetes de parição?

- a) sim
- b) não

34. Os abortos ocorreram em que época aproximadamente?

- a) 1° terço gestacional
- b) 2° terço gestacional
- c) 3° terço gestacional.

35. Utiliza touros emprestados?

- a) sim
- b) não

36. Tipo de cobertura:

- a) monta natural
- b) inseminação artificial
- c) transferência de embriões

37. Qual procedência do sêmen:

- a) comprado
- b) própria fazenda

38. Se comprado, e atestado sanitariamente?

- a) sim
- b) não

45. Destino dos fetos abortados:

- a)Enterro/remoção/queima
- b)Deixa no pasto

ASPECTOS CLÍNICOS

39. Presença de vacas com sinais de pneumonia/quadro respiratório:

- a) sim
- b) não

40. Presença de vacas com artrite com ou sem claudicação:

- a) sim
- b) não

41. Vacas com sinais de Ceratoconjuntivite:

- a) sim
- b) não

42. Presença de vacas com mastite:

- a)sim
- b)não

43. Se tratado, obteve sucesso?

- a) sim
- b) não

44. Aplicação de medicamento intramamário:

- a)sim
- b)não

ANEXO

ANEXO 1



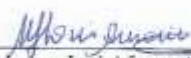
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	042/2015
Número do processo	23082.007887/2015
Data de emissão da licença	04 de Maio de 2015
Título do Projeto	Análise epidemiológica da infecção por Mycoplasmataceae em bovinos da microrregião Garanhuns, estado de Pernambuco.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	José Wilton Pinheiro Júnior
Colaboradores	Daniel Friguglietti Brandespim; Sandra Batista dos Santos; Júnior Mário Baltazar de Oliveira; Érica Chaves Lúcio; Bruno Pajeú e Silva; Jonas de Melo Borges; Larice Bruna Ferreira Soares.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Bovino; total de 385 animais.


Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof. Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA