

GRASIENE DE MENESES SILVA

**OCORRÊNCIA DE DNA DE *MOLLICUTES* NO TRATO GENITAL
DE FÊMEAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*) NO ESTADO DE
PERNAMBUCO**

GARANHUNS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES – PGRSS

GRASIENE DE MENESES SILVA

OCORRÊNCIA DE DNA DE *MOLLICUTES* NO TRATO GENITAL
DE FÊMEAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*) NO ESTADO DE
PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Programa de Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

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

Garanhuns

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO – UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES – PGRSS

OCORRÊNCIA DE DNA DE *MOLLICUTES* NO TRATO GENITAL
DE FÊMEAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*) NO ESTADO DE
PERNAMBUCO

Dissertação elaborada por:

GRASIENE DE MENESES SILVA

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Presidente da Banca – Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu

Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

DEDICATÓRIA

*Às meus pais e irmã por todo amor e apoio.
Não poderia ter escolhido família melhor para me receber nessa vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que ele tem me presenteado: família, amigos, profissão. Pelas experiências que tive durante esses anos de vida que só me fazem acreditar que existe sim algum ser superior que cuida de nós, mas não um ser superior que habita lugares longínquos, mas sim um Deus que existe dentro de nós.

Aos meus pais Lourdes e Valdimi pelo amor, carinho e por todo apoio que sempre me deram mesmo de longe, especialmente, a minha mãe por acreditar sempre em mim mais do que eu mesma e SEMPRE me incentivar e me acalmar em todos os momentos independente da situação. Se um dia for mãe, quero seguir o seu exemplo.

A minha irmã Suyane pelo apoio, não teria chegado nem na metade se eu não pudesse contar com a sua companhia ao lado dos nossos pais. Mesmo tão diferentes, o amor a eles nos une.

Ao meu namorado e companheiro Caio Santoro por surgir num momento tão bacana de minha vida. Obrigada por fazer parte desse momento, lembrar-me de cuidar de mim, lembrar-me de que existem coisas mais importantes, por repensar algumas escolhas. Obrigada por sempre me ouvir mesmo quando o assunto foge ao seu conhecimento e me estimular a novas experiências. Obrigada pelos momentos tão divertidos. Que você fique e aproveite a bagunça!!

A Emanuela Mesquita, não por ser uma companheira de trabalho, mas por ser uma amiga que ganhei para a vida. Obrigada por me ajudar, a cheirar xilol comigo, pelos risos e choros, pelas conversas filosóficas, por compartilharmos as angústias, alegrias e conquistas. Todo sucesso e felicidade do mundo.

A todos os amigos que fiz em Recife, por saber que teria com quem contar e dividir alegrias, especialmente, Dayane Santos, nos encontramos pelo mundo. E a todos os que mesmo longe continuam presente, pedindo notícias e torcendo por mim.

Aos meus companheiros do LIDIC, sem exceção (não me atrevo a citar nomes), dos mais antigos aos mais recentes, dos presentes aos que partiram, agradeço por esses quase 4 anos de convivência, muitas experiências boas, muita diversão, muito conhecimento dividido. O esforço e a dedicação de cada um os levarão longe.

Aos professores Wilton Júnior e Rinaldo Mota por me receberem tão bem, pela paciência e pelos ensinamentos. Admiro a dedicação e o entusiasmo que demonstram no exercício de nossa profissão. A Sandra Batista pela amizade e co-orientação, muito obrigada pela paciência.

A UFRPE por me conceder meios de me qualificar, a todos os professores que contribuíram de alguma forma e aos funcionários, em especial dona Guiomar com sua “alegria” e dedicação. Seu Ricardo e Claudinha, mulher com um dos maiores corações que conheci.

A todos minha eterna gratidão!

“Tome cuidado com o vazio de uma vida ocupada demais”

Sócrates

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa determinar a ocorrência de DNA de micro-organismos da classe *Mollicutes* no trato genital de fêmeas bubalinas no estado de Pernambuco. Foram analisadas 292 amostras de *swab* vaginal procedentes de búfalas em idade reprodutiva de nove propriedades, distribuídas em cinco municípios. Para a detecção do DNA utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A ocorrência de fêmeas positivas para *Mollicutes* foi 4,8% (14/292). Em relação ao número de propriedades com fêmeas positivas, constatou-se que 44,4% (4/9) das propriedades possuíam, ao menos, uma fêmea infectada por *Mollicutes*. As amostras positivas na PCR foram cultivadas em meios específicos, mas não houve crescimento de colônias características. Conclui-se que DNA dos micro-organismos da classe *Mollicutes* estão presentes no trato reprodutivo de búfalas no estado de Pernambuco. Apesar da baixa ocorrência, a presença do DNA desses micro-organismos deve ser investigada com o intuito de avaliar se espécies patogênicas para o trato reprodutivo podem estar presentes nestes rebanhos causando possíveis perdas econômicas aos criadores.

Palavras-chave: Bubalinos, doença reprodutiva, epidemiologia.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the occurrence of DNA from microorganisms of the *Mollicutes* class in the genital tract of buffalo females in the state of Pernambuco. We analyzed 292 vaginal swab samples from buffaloes of reproductive age from nine farms, distributed in five municipalities. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for DNA detection. The occurrence of *Mollicutes* positive females was 4.8% (14/292). Regarding the number of properties with positive females, it was found that 44.4% (4/9) of the properties had at least one female infected with *Mollicutes*. PCR positive samples were cultured in specific media, but no characteristic colonies were grown. It is concluded that DNA of the microorganisms of the class *Mollicutes* are present in the reproductive tract of buffaloes in the state of Pernambuco. Despite the low occurrence, the presence of the DNA of these microorganisms must be investigated in order to evaluate if species pathogenic to the reproductive tract can be present in these herds causing possible economic losses to the breeders.

Key words: Buffaloes, reproductive disease, epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Área de estudo, municípios do estado de Pernambuco que participaram da pesquisa.....	34
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Registros das principais espécies de <i>Mollicutes</i> associadas a enfermidades em diferentes hospedeiros susceptíveis.....	17
Quadro 2 - Prevalência da infecção por <i>Mollicutes</i> associados a problemas reprodutivos em bovinos no Brasil.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das amostras positivas para a classe <i>Mollicutes</i> nos municípios estudados.....	36
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Etiologia.....	16
3.2 Epidemiologia.....	17
3.3 Patogenia e sinais clínicos	19
3.4 Diagnóstico	21
3.5 Profilaxia.....	23
4. REFERÊNCIAS	25
5.1. ARTIGO 1: OCORRÊNCIA DE DNA DE MOLLICUTES NO TRATO GENITAL DE FÊMEAS BUBALINAS (<i>Bubalus bubalis</i>) NO ESTADO DE PERNAMBUCO.....	31
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

1. INTRODUÇÃO

A adaptação, a elevada fertilidade e a rusticidade dos búfalos aliada à possibilidade de sua exploração para a produção de carne, leite e tração, despertaram o interesse de muitos pecuaristas no Brasil (BERNARDES, 2011). O rebanho bubalino brasileiro está estimado em torno de 1,37 milhões, com destaque para a região norte com 66,3% do rebanho nacional. No Nordeste, o estado de Pernambuco apresenta o terceiro maior rebanho da região com aproximadamente 10 mil cabeças (PPM, 2015).

Para o emprego da bubalinocultura, os sistemas de produção existentes utilizam tecnologias inicialmente desenvolvidas para os bovinos com pequenas adaptações (BASTIANETTO, 2009; BERNARDES, 2011). A progressiva intensificação na produção, caracterizada por seleção genética, mudança na alimentação, confinamento e contato com outras espécies, propiciou a ocorrência de diversas enfermidades, antes apenas descritas em bovinos (VARGAS et al., 2014).

Dentre essas doenças, as que causam maiores prejuízos econômicos são as que acometem o sistema reprodutivo (GIVENS; MARLEY, 2008). As enfermidades podem ser congênitas, genéticas ou adquiridas e podem ocasionar consequências como: retenção de placenta, endometrite, placentite, morte embrionária e abortos (AL-KENNANY, 2010; AZAWI, 2011; MODI et al., 2011; ROLIM FILHO et al., 2011).

Sabe-se que alguns micro-organismos podem causar direta ou indiretamente problemas reprodutivos (PERUMAL et al., 2013). Alguns patógenos que acometem o sistema reprodutivo de bovinos já foram relatados em búfalos, tais como: *Brucella* spp., *Leptospira* spp. (BASTIANETTO, 2009) e *Chlamydophila abortus* (GRECO et al., 2007). Porém, poucas pesquisas foram realizadas com micro-organismos da classe *Mollicutes* nessa espécie (SHARMA et al., 1996; MAROUF et al., 2011).

Na classe *Mollicutes*, os gêneros *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. apresentam importância histórica e persistem interferindo na pecuária por afetarem negativamente a reprodução (BUZINHANI et al., 2007). O gênero *Mycoplasma* está associado a casos de vulvovaginite granular, com descarga vaginal mucopurulenta, infertilidade e endometrite necrosante (CARDOSO; VASCONCELOS, 2004). Já as infecções por *Ureaplasma*

diversum estão associadas a casos de aborto, repetição de estro, vulvovaginite granular e infertilidade (BUZINHANI et al., 2007; PÔRTO, 2008).

Em bovinos as espécies de *Mollicutes* associadas a problemas reprodutivos são *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* (CARDOSO, 2003), mas na espécie bubalina apenas as espécies *Mycoplasma bovis* (MAROUF et al., 2011) e *Mycoplasma bovigenitalium* (SHARMA et al., 1996; MAROUF et al., 2011) foram descritas em pesquisas sobre a participação desses agentes em problemas reprodutivos no mundo.

No Brasil, pesquisas com bovinos tem encontrado micro-organismos da classe *Mollicutes* causando problemas reprodutivos em vários estados como, Paraíba (SANTOS et al., 2013); São Paulo, Goiás, Santa Catarina (BUZINHANI et al., 2007); Alagoas (OLIVEIRA et al., 2005) e Pernambuco (SANTOS et al., 2015; MACÊDO, 2017). Entretanto, não existem relatos da infecção em búfalos. Desta forma, objetivou-se com esta pesquisa determinar a ocorrência de DNA de bactérias da classe *Mollicutes* em fêmeas bubalinas estado de Pernambuco.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar um estudo para determinar a ocorrência de DNA de *Mollicutes* no trato genital de fêmeas bubalinas (*Bubalis bubalis*) no estado de Pernambuco.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a detecção de DNA de *Mollicutes* no trato genital de fêmeas bubalinas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir de *swabs* vaginais;
- Realizar o isolamento de micro-organismos da classe *Mollicutes*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Etiologia

As micoplasmoses são causadas por micro-organismos simples e diminutos pertencentes à classe *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales* (EDWARD; FREUNDT, 1967), família *Mycoplasmataceae*, que abrangem alguns gêneros como: *Achaloplasma* spp., *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp. (FREUNDT, 1955). São descritas, aproximadamente, 200 espécies de *Mollicutes*, algumas dessas, da família *Mycoplasmataceae*, são consideradas patogênicas e de importância na medicina veterinária (TIMENETSKY; BUZINHANI, 2009).

Mollicutes foram isolados pela primeira vez por Nocard e Roux (1898), na França, em bovinos com Pleuropneumonia. Esses micro-organismos apresentam como principal característica a ausência de parede celular, o que os tornam resistentes a antibióticos que atuam na síntese desta, dificultando o seu controle. A presença da membrana plasmática, desprovida da proteção da parede celular, torna-os fracamente corados pela técnica de Gram (KUHN; HOPKINS, 1983), porém são considerados Gram-negativos (CARDOSO et al., 2000; ROTTEN, 2003).

São anaeróbios facultativos, replicam-se por fissão binária, são considerados de difícil cultivo em decorrência do seu genoma pequeno, que varia de 0,58-1,35Mb (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999) o que limita seu metabolismo e vias biossintéticas exigindo para o seu cultivo meios enriquecidos que disponham de precursores para a biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (ROSEMBUSH, 1994; ROTTEM, 2003).

Apesar da ausência da parede celular dificultar a ação de antibióticos, essa característica os tornam sensíveis as condições adversas do meio, ocorrendo a lise de sua membrana plasmática por choque osmótico, como quando entram em contato com detergentes, álcoois e variações bruscas de pH e temperatura (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999).

3.2 Epidemiologia

Apesar de sua relevância, as micoplasmoses reprodutivas não são de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), não existem dados oficiais sobre sua prevalência e distribuição. Pesquisas realizadas têm demonstrado algumas semelhanças entre ovinos (RIZZO et al., 2011), búfalos (MAROUF et al., 2011) e bovinos (SANTOS et al., 2015) infectados, como espécies envolvidas nas infecções, sinais clínicos, vias de eliminação, transmissão e profilaxia.

Mollicutes podem ser encontrados como comensais, oportunistas e em menor quantidade, como patógenos primários em vários hospedeiros susceptíveis, tais quais: caninos (SILVA-SANTOS, 2014), felinos, suínos (YAMAGUTI, 2009), ratos (DEMOLIN et al., 2010), ovinos (RIZZO et al., 2011), bovinos (SANTOS et al., 2015), búfalos (KAUR; SHARMA; ARORA, 2015) e humanos (CAMILO et al., 2014) causando doenças em vários sistemas, conforme demonstrado no Quadro 1 (TIMENETSKY; BUZINHANI, 2009).

Quadro 1 - Registros das principais espécies de *Mollicutes* associadas a enfermidades em diferentes hospedeiros susceptíveis.

Autor	Gênero ou Espécie	Hospedeiro	Sistema envolvido
Silva-Santos (2014)	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	Canina	Sistema reprodutivo Sistema respiratório
Yamagute (2009)	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> <i>Mycoplasma flocculare</i>	Suína	Sistema respiratório
Santos et al. (2015)	<i>Mycoplasma</i> spp. <i>U. diversum</i>	Bovina	Sistema reprodutivo
Churchward et al. (2012)	<i>Mycoplasma mycoides</i> subspecies <i>mycoides</i>		Sistema respiratório
Radaelli et al. (2011)	<i>Mycoplasma bovis</i>		Glândula mamária
Rizzo et al. (2011)	<i>Ureaplasma</i> spp. <i>Mycoplasma</i> spp.	Ovina	Sistema reprodutivo
Sousa (2013)	<i>Ureaplasma diversum</i> <i>Mycoplasma</i> spp.		Sistema reprodutivo
Kaur; Sharma; Arora (2015)	<i>Mycoplasma</i> spp.	Bubalina	Sistema reprodutivo
Marouf; El-Jakee; Mohamed; (2011)	<i>Mycoplasma bovigenitalium</i> <i>Mycoplasma bovis</i>		Sistema reprodutivo
Ferreira et al. (2008)	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Ratos	Sistema respiratório

O primeiro relato de micoplasmose em búfalas foi descrito por Sharma et al. (1996), que isolaram *M. bovis genitalium* da secreção muco-vaginal de búfalas. Posteriormente, no Egito, Marouf et al. (2011) coletaram amostras de *swab* vaginal de dez búfalas, provenientes de matadouros de diferentes cidades no Egito, e obtiveram 30% (3/10) de amostras positivas na PCR, sendo um *Mycoplasma bovis genitalium*, um *Mycoplasma bovis* e um *Mycoplasma* spp. Em 2015, Kaur et al., conseguiram diagnosticar *Mycoplasma* spp. em *swab* vaginal e conteúdo estomacal de fetos abortados de bovinos e búfalos, utilizando PCR-multiplex.

No Brasil não existem relatos da infecção por *Mollicutes* em búfalos, entretanto alguns estudos foram desenvolvidos em bovinos, determinando uma prevalência de 12,5 a 81,8% para *Mycoplasma* spp. e entre 6,0 a 64,4% para *Ureaplasma diversum* (Quadro 2).

Quadro 2- Prevalência da infecção por *Mollicutes* associados a problemas reprodutivos em bovinos no Brasil.

AUTOR	ANO	LOCAL	MÉTODO	PREVALÊNCIA (%)	
				<i>Mycoplasma</i> spp.	<i>U. diversum</i>
Cardoso et al.	2000	SP	Isolamento	-	38,8
Oliveira Filho et al.	2005	AL	Isolamento	-	41,6
Nascimento et al.	2005	MG	Isolamento	57,1	-
Buzinha; Metiffogo; Timenetsk	2007	SP	PCR Isolamento	63,7 12,5	37,5 25,0
Gambarini et al.	2009	Centro-Oeste	Isolamento	15,6	64,4
Marques et al.	2013	SP e BA	PCR	72,8*	38,1
Santos et al.	2013	PB	PCR	65,6*	15,6
Gaeti et al.	2014	MT	PCR	-	38,0
Santos et al.	2015	PE	Isolamento PCR	13,0 26,0*	6,0 13,0
Macêdo	2017	PE	PCR Isolamento	9,2% 81,8	21,6 24,6

**Mollicutes*; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

A fonte de infecção é o próprio hospedeiro (BUZINHANI et al., 2007), que pode albergar esses micro-organismos por meses ou anos se comportando como reservatórios (NICOLAS; AYLING, 2003; ROCHA, 2009). As vias de eliminação dos micro-organismos estão vinculadas ao sistema envolvido, geralmente, contendo secreções naturais e/ou excreções e descargas purulentas (TIMENETSKY; BUZINHANI, 2009). Nas espécies que causam problemas reprodutivos, as vias de eliminação são sêmen e muco

prepucial (CARDOSO; VASCONCELOS, 2004), vaginal (OLIVEIRA FILHO et al., 2005), descargas uterinas e restos placentários (KAUR et al., 2015).

Mycoplasmas e *Ureaplasmas*, principais agentes etiológicos envolvidos em problemas reprodutivos em ruminantes, podem infectar os susceptíveis pelo contato direto com as secreções e/ou excreções eliminadas pelo trato reprodutivo ou por fômites contaminados (NASCIMENTO et al., 2005; ROCHA, 2009). Outra preocupação é a respeito da transmissão vertical do agente, que já foi descrita em alguns estudos pelo isolamento do patógeno em fetos abortados e anexos fetais (KIRKBRIDE, 1987; BIELANSKI et al., 2000; KAUR et al., 2015).

Pesquisas têm comprovado, por exemplo, que *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas* não são destruídos pelos processos de tratamentos ao qual o sêmen é submetido, demonstrando a importância da monta natural ou inseminação artificial com sêmen contaminado na transmissão (CARDOSO, 2006). Além da monta natural e inseminação artificial, a transmissão pode ocorrer durante a produção de embriões *in vitro*, pois *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas* ficam aderidos à zona pelúcida (THIBIER, 2001; NASCIMENTO et al., 2005).

Os fatores de risco para as micoplamoses reprodutivas envolvem aspectos gerais como: idade, estresse térmico, movimentação constante de animais, estresse alimentar (fornecimento, tipo de alimento e exigência nutricional), fase gestacional, ambientes contaminados e tipo de exploração animal (MACHADO; BICALHO, 2015). Além de fatores no âmbito reprodutivo como: uso de sêmen não certificado quanto a ser livre de patógenos; uso de instrumentos de inseminação contaminados (KIRKBRIDE, 1987; BIELANSKI, 2000); empréstimo de reprodutores; uso de touro de repasse; e o não isolamento de animais com distúrbios reprodutivos (MACÊDO, 2017).

3.3 Patogenia e sinais clínicos

A patogenicidade dos micoplasmas e ureaplasmas no aparelho reprodutivo de búfalos é pouco conhecida. Com isso, considera-se a patogenia dos micro-organismos da classe *Mollicutes* para explicar a ação destes nos tecidos, em decorrência dos vários

mecanismos que possuem para se instalarem e escaparem da ação imunológica do hospedeiro (TIMENETSKY; BUZINHANI, 2009).

Mollicutes apresentam a capacidade de se aderirem fortemente às células do hospedeiro. Algumas espécies podem, inclusive, invadir as células em consequência da sua incapacidade de sintetizar algumas substâncias essenciais ao seu metabolismo, o que as tornam dependentes de alguns componentes da célula do hospedeiro. Nesse processo, podem ocorrer alterações deletérias, em menor ou maior grau, nos tecidos, constituindo-se um dos mecanismos de patogenicidade (RAZIN et al., 1998).

A aderência às células é possível graças à morfologia desses patógenos, que se apresentam na forma filamentosa ou em clavas, com a presença de uma organela com uma proeminência na extremidade polar da célula. Esta estrutura é constituída de adesinas e por proteínas acessórias que permitem a eficiência da adesão. Nos casos de infecções reprodutivas, essa adesão é requisito para sua sobrevivência e patogenicidade, evitando, assim, que eles sejam eliminados pelas secreções e fluxo urinário (ROTTEM, 2003).

Essa aderência proporciona um microambiente que permite a liberação de metabólitos tóxicos e enzimas, tais como o peróxido de hidrogênio e amônia. Esses compostos se acumulam e causam danos aos tecidos que podem ser detectados, por exemplo, pelas lesões encontradas na mucosa vaginal (WAITES et al., 2005).

As lesões de vulvovaginite granular são caracterizadas por hiperemia, desenvolvimento de nódulos de cor cinza, marrons ou avermelhados, que podem se romper. Essas lesões podem apresentar vários graus de intensidade e severidade, aparecem, geralmente, de um a cinco dias, após a infecção e podem persistir por vários meses, tornando-se pequenas e translúcidas, dificultando por vezes sua detecção. Posteriormente podem retornar à forma inicial, com presença de descarga purulenta nos estros subsequentes (METTIFOGO, 2000).

Os casos de infertilidade e morte embrionária, causadas por micoplasmas e ureaplasmas estão relacionados à colonização desses micro-organismos no útero. Uma vez presentes no canal vaginal, estes podem ser introduzidos através da abertura da cérvix, principalmente no estro, pela inseminação artificial ou monta natural e causar endometrite, interferindo na implantação ou mesmo a morte do embrião (MILLER et al.,

1994).

Segundo Smits et al. (1994), quando *U. diversum* e *M. bovis genitalium* estão presentes na tuba uterina, podem ocasionar diminuição ou o cessamento da atividade ciliar, interferindo na concepção e no desenvolvimento inicial do embrião. *U. diversum* também é responsável por perdas embrionárias por estimular a síntese de prostaglandina F2a, potente hormônio luteolítico, ou inibir a síntese de prostaglandina E2 (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994).

Os casos de aborto, nascimento prematuro ou morte de bezerros fracos recém-nascidos ocorrem devido à placentite, a qual se evidencia fibrose difusa, infiltrado de células mononucleares, áreas de necrose, exsudato fibrinoso e mineralização; ou em consequência de pneumonia que acomete o feto, com maior ocorrência no terço final da gestação (MILLER et al., 1994; METTIFOGO, 2000).

Para evadir-se de respostas imunológicas e permanecerem viáveis, os micoplasmas utilizam alguns mecanismos, como a capacidade de modificarem a natureza e a estrutura dos componentes de suas membranas, o que lhes conferem resistência à tentativa de destruição pelos sistemas de defesa (POUMARAT et al., 1997). A produção de substâncias, como a tiol oxidase, que os protegem contra os produtos metabólicos produzidos por si mesmo e o próprio exsudato fibrinoso, presente nas infecções, que os protegem dos anticorpos e das drogas antimicrobianas (CORDOVA, 2002).

3.4 Diagnóstico

As micoplasmoses, por ocasionarem sinais clínicos compatíveis com outras doenças reprodutivas, são de difícil diagnóstico somente pelo histórico do rebanho. Por esse motivo, exigem-se técnicas laboratoriais diretas ou indiretas, que proporcionem a detecção desses micro-organismos (ROCHA, 2009).

Os materiais biológicos de eleição para o diagnóstico são: secreção muco-vaginal e/ou cervical (MAROUF et al., 2011), muco prepucial e sêmen fresco ou congelado

(CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004). Outros materiais podem ser utilizados como restos placentários e conteúdo estomacal de fetos abortados (KAUR et al., 2015).

Independente da técnica escolhida, alguns cuidados devem ser tomados durante a coleta e transporte do material biológico. Fatores como contaminação da amostra durante sua obtenção; acondicionamento em temperatura inadequada; demora no transporte até o laboratório; e meios de transporte não apropriados, para as exigências de sobrevivência e multiplicação destes agentes, podem inviabilizar a amostra clínica (BUZINHANI et al., 2007).

Das técnicas disponíveis, o cultivo/isolamento é considerado o padrão ouro no diagnóstico das micoplasmoses. Esse método, porém, exige cuidados especiais em decorrência da dificuldade de isolamento do agente (OLIVEIRA, 2008). Para isso, são necessários meios de cultura próprios, para o gênero *Mycoplasma* o meio de escolha é Hayflick (WHITFORD et al., 1994) e para o gênero *Ureaplasma*, meio UB (RAZIN; TULLY, 1996).

Após o isolamento, é necessária a correta realização de testes bioquímicos para a identificação das espécies. Esses testes consistem em provas que incluem: hidrólise da ureia, fermentação da glicose, hidrólise da arginina, atividade de fosfatase, formação de filmes e bolhas, redução do tetrazolio, liquefação de soro coagulado e hidrólise da caseína (WHITFORD et al., 1994; ROCHA, 2009).

Devido à natureza altamente contagiosa do patógeno e os impactos produzidos quando introduzido em um rebanho, é importante que os resultados do diagnóstico sejam rápidos para que os animais infectados possam ser removidos e seja minimizada sua propagação, o que, na maioria das vezes, não ocorre na técnica de isolamento, que exige até 21 dias de cultivo. Outra desvantagem é que alguns micro-organismos, semelhantes e/ou contaminantes, podem crescer associados aos *Mollicutes* (PARKER, 2017).

Para minimizar esses problemas outras técnicas vêm sendo empregadas e nos últimos anos, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tornou-se um método comum para identificação de várias espécies de *Mollicutes* (PARKER, 2017). Essa técnica apresenta a vantagem de possuir maior sensibilidade e especificidade, tornando a detecção do agente mais rápida e precisa (BUZINHANI et al., 2007). Outra vantagem desse método é a

identificação do micro-organismo mesmo não sendo mais viável, o que torna impossível sua detecção no cultivo e isolamento (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004).

Vários tipos de PCR podem ser utilizados na detecção da classe *Mollicutes*, em relação aos seus gêneros e espécies (KOBAYASHI et al., 1998; MAROUF et al., 2011). Estão disponíveis a PCR convencional, *Nested-PCR*, que consiste no duplo processo de amplificação do material genético (CARDOSO et al., 2000); PCR *multiplex*, que detecta mais de uma espécie ou micro-organismo em uma mesma reação (TRAMUTA et al., 2011; KAUR et al., 2015); e PCR em tempo real (MARQUES et al., 2013).

3.5 Profilaxia

Estudos sobre as micoplasmoses tem demonstrado que sua erradicação é difícil, uma vez que a vacinação não é eficaz (NICHOLAS; AYLING, 2003) e o tratamento com antibióticos é pouco efetivo, em consequência da resistência que *Mollicutes* apresentam aos principais fármacos (KUHN; HOPKINS, 1983). Com isso, a aplicação de medidas profiláticas, principalmente relacionadas aos fatores de risco, pode evitar a disseminação desses patógenos (MACEDO, 2017).

As medidas profiláticas envolvem os aspectos epidemiológicos desse micro-organismo, além de cuidados semelhantes aos indicados para as principais doenças infecciosas que causam problemas reprodutivos nos rebanhos (DE FAVA et al., 2003). No geral, medidas que possibilitem o bem estar animal, como qualidade dos alimentos, conforto térmico, condições adequadas de criação e instalação são estratégias que contribuem na prevenção de doenças (TILLARD et al., 2008).

O controle reprodutivo também é importante e pode ser feito pelo acompanhamento reprodutivo frequente, levando em consideração todas as ocorrências reprodutivas desde o nascimento ou aquisição de cada animal. Este controle tem como finalidade conhecer o intervalo de partos, identificar aquelas que repetem cio, observar a ocorrência e frequência de abortos e observar, quando possível, à presença ou não de lesões no aparelho reprodutivo, fatores que podem indicar a presença do agente no rebanho (NASCIMENTO FILHO et al., 2005; ROCHA, 2009).

Outras medidas incluem controle rígido do trânsito dos animais na propriedade, monitoramento semestral da enfermidade (DE FAVA et al., 2003) e aquisição de sêmen certificado como sendo livre de patógenos (VIANNA et al., 2004). Em relação ao ambiente, cuidados com as fontes da infecção podem ser tomadas pela desinfecção dos fômites com desinfetantes apropriados (CHAMBAUD; WRÓBLEWSKI; BLANCHARD, 1999).

4. REFERÊNCIAS

AL-KENNANY, E.R.; RAHAWY, M.A.; AL-ALLAF, E.S. Clinical and pathological study of retained placenta in Iraqi buffaloes. *Journal of Veterinary Medical Science*. v. 9, n. 1, p.6-11. 2010.

AZAWI, O.I.; ALI, A.J. A study on the prevalence of some pathological abnormalities of the uterus diagnosed at post mortem of buffaloes in Mosul. *Buffalo Bulletin*. v. 30, n. 1, p. 67-71. 2011.

BASTIANETTO, E.; LEITE, R. C. Doenças infecciosas em búfalos. 2009. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/viewFile/7665/5438>. Acesso em: 15/05/2017

BERNARDES, O. Os Búfalos no Brasil. Ingai.agr, Sarapuí-SP. Disponível em: http://www.ingai.agr.br/artigos/Bufalos%20no%20Brasil_v2.pdf. Acesso em: 18/08/2016.

BIELANSKI, A.; DEVENISH, J.; PHIPPS-TODD, B. Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovis genitalium* in semen on fertilization and association with in vitro produced mórula and blastocyst stage embryos. *Theriogenology*. v. 53, n. 6, p. 1213-1223. 2000.

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*. v. 59, n. 6, p. 1368-1375. 2007.

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

CAMILO, C. C.; MONTE, R. L.; BARCELLOS, J. F. M. O papel dos micoplasmas nas infecções urogenitais. *Scientia Amazonia*. v. 3, n. 1, p. 81-95. 2014.

CARDOSO, M. V.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L. M. P.; TEIXEIRA, S. R.; GENOVEZ, M. E. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. *Animal reproduction science* v. 63, n. 4, p. 137–143. 2000.

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

CARDOSO, M.V. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e central de inseminação artificial. *Arquivos do Instituto Biológico*. v.73, p.33-40. 2006.

CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between *Mycoplasma* lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiology*, v. 7, n. 12, p. 493–9.1999.

CHELMONSKA-SOYTA, A.; MILLER, R.B.; RUHNKE, L.; ROSENDAL, S. Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v. 58, n. 4, p. 275-280. 1994.

CHURCHWARD, C. P.; HLÚŠEK, M.; ROBIN A.J.; AYLING, R.D.; MCAULIFFE, L. A simplified PCR method for genotyping *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony: The aetiologic agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Veterinary Microbiology*. v. 159, p. 257–259. 2012

CORDOVA, M.M. Desenvolvimento de plasmídeos replicativos artificiais para transformação de *Mycoplasma pulmonis*, *M. capricolum* e *M. mycoides subsp. mycoides*, e interrupção do gene hemolisina A de *M. pulmonis* por recombinação homóloga. 2002. Tese. Universidade de São Paulo, São Paulo. 133p. 2002.

EDWARD, D. G. F. F.; FREUNDT, E. A. Proposal for mollicutes as name of the class established for the order Mycoplasmatales. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 17, n. 3, p. 267–268. 1967.

FERREIRA, J.B.; YAMAGUTI, M.; MARQUES, L.M.; OLIVEIRA, R. C.; NETO R. L.; BUZINHANI, M.; TIMENETSKY, J. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in laboratory rats and technicians. *Zoonoses Public Health*. v.55, n. 5, p. 229-34. 2008.

FREUNDT, E. A. The classification of the pleuropneumonia group of organisms (Borrelomycetales). *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. v. 5, n. 2, p. 67–78. 1955.

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. *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. v. 46, p. 1059–1063. 2014.

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. 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 Production*. v. 41, p. 1421–1426. 2009.

GIVENS M. D.; MARLEY M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*. v. 70, n. 3, p. 70-85. 2008.

GRECO, G.; D'ABRAMO, M.; CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; CORRENTE, M.; BUONAVOGLIA, D. Reproductive disorders induced by *Chlamydophila* spp. Infections in an Italian mediterranean buffalo (*bubalus bubalis*) herd. *Journal Animal Science*. v. 6, n. 2, p. 877-880. 2007.

GRECO, G.; D'ABRAMO, M.; CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; CORRENTE, M.;

BUONAVOGLIA, D. Reproductive disorders induced by *Chlamydomphila* spp. infections in an Italian mediterranean buffalo (*bubalus bubalis*) herd. *Journal Animal Science*. v. 6, n. 2, p. 877-880. 2007.

KAUR, P.; SHARMA, N S.; ARORA, A K. Development of a multiplex PCR assay for detection of different bacterial pathogens associated with reproductive disorders in cattle and buffaloes. *Indian Journal of Animal Sciences*. v. 85, n. 12, p.1306–1310. 2015.

KIRKBRIDE, C.A. Mycoplasma, ureaplasma, and acholeplasma infections of bovine genitalia. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. v.3, p. 575-591. 1987.

KOBAYASHI, H.; HIROSE, K.; WORARACH, A.; PAUGTES, P.; ITO, N.; MOROZUMI, T.; YAMAMOTO, K. In vitro amplification of the 16S Rna genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovirhinis* by PCR. *Journal of veterinary medical science*. v. 60, n. 12, p. 1299–1303. 1998.

KUHN M.J.: HOPKINS S.M. A clinical review of bovine ureaplasmosis. *Iowa State University Veterinarian* v. 45, n. 1, p. 20-24. 1983.

LYSNYANSKY, I.; BRENNER, J.; ALPERT, N.; BENJAMIN, A.; BERNSTEIN, M.; ELAD, D.; BLUM, S.; FRIEDGUT, O.; ROTENBERG, D. Identification of *Mycoplasma bovirhinis* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. *Veterinary Record*. v. 165, p. 319–322. 2009.

MACÊDO, A. A. Análise epidemiológica da infecção por *Mycoplasma bovirhinis* e *Ureaplasma diversum* em bovinos na microrregião do Vale do Ipanema-Pernambuco. 2017. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE. 57p. 2017.

MAROUF, S.A.; MOHAMED, KH.F.; EL-JAKEE, J. Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovirhinis* in Cattle and Buffalo in Egypt using Dot ELISA and PCR with Anti-Microbial Trials. *European Journal of Biological Sciences*. Egypt. v. 3, n. 1, p. 01-08. 2011.

MARQUES, L. M.; AMORIM, A. T.; MARTINS, H. B.; REZENDE, I. S.; BARBOSA, M. S.; LOBÃO, T. N.; CAMPOS, G. B.; TIMENETSKY, J. A quantitative TaqMan PCR assay for the detection of *Ureaplasma diversum*. *Veterinary Microbiology*. v. 167, n. 3, p. 670–674. 2013.

METTIFOGO E. Efeitos da infecção por micoplasmas no trato reprodutivo de bovinos: diagnóstico, controle e tratamento - Revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.24, p. 83-89. 2000.

MILLER, R.B.; CHELMONSKA-SOYTA, A.; SMITS, B.; FOSTER, R.; ROSENDAL, S. *Ureaplasma diversum* a cause of reproductive disease in cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*., v.10, p. 479-490. 1994.

MODI, L. C.; PATEL, P. A.; PATEL, S.P.; PATEL, G.G.; JOSHI, A.H.; SUTHAR, D.N. Prevalence of reproductive problems in buffalo in Mehsana Milk-Shed Area of Gujarat.

Revista IJAVMS. v. 5, n. 4, p. 424-428. 2011.

NASCIMENTO, M. D. G. F.; FREITAS D'ANGELIS, F. H.; NASCIMENTO, E. R.; RESENDE, A. O. Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 33, n. 2, p. 195–199. 2005.

NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*. v. 74, n. 2, p. 105–112. 2003.

NOCARD E.; ROUX E. R. Le microbe de la peripneumonie. *Annales de l'Institut Pasteur*. v. 12, p. 240–262. 1898.

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.

OLIVEIRA, R. C., Isolamento de ureplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e sequenciamento do gene 16S rRNA. 2008. 138 f. **Tese** (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

PERUMAL, P.; KIRAN KUMAR, T.; SRIVASTAVA, S.K. Infectious causes of infertility in Buffalo bull (*Bubalus bubalis*). *Buffalo Bulletin*. v. 32, n. 2, 2013.

PÔRTO R. N. G. Micoplasmose e ureaplasmose genital de bovinos: Avaliação histopatológica do trato reprodutor feminino e estudo dos mecanismos de ativação do sistema imune inato. 2008. **Tese** (Doutorado), Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 94p. 2008.

RAZIN, S., & TULLY, J. G. **Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmaology**. ed. 2. California: Academic Press, 463. 1996.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 63, p. 1094-1156. 1998.

RIZZO, H.; MEIRA JUNIOR, E. B. S.; OLIVEIRA, R. C.; YAMAGUTI, M.; BUZINHANI, M.; TIMENETSKYI, J.; GREGORY, L. Isolamento e PCR para detecção de *Mollicutes* em muco vaginal e sua associação com problemas reprodutivos em ovinos criados na região de Piedade, São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*. v. 41, n. 2, p. 324-329.

ROCHA J. M. N. Micoplasmose em bovinos de aptidão leiteira: fatores predisponentes para a ocorrência e manifestação da síndrome da vulvovaginite granular. 2009. **Tese** (Doutorado). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, Goiás. 2009.

ROTTEM. S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*. v. 83, n. 2, p. 417- 432. 2003.

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. Recovery of *Mollicutes* from the reproductive tract of dairy cattle in the state of Pernambuco, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 35, n. 6, p. 491–496. 2015.

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. Ocorrência de *Mollicutes* e *Ureaplasma* spp. em surto de doença reprodutiva em rebanho bovino no estado da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 33, n. 3, p. 315–318. 2013.

SHARMA, V.; DHANESAR, N. D.; MEHRA, K. N. Pathogenicity of *Mycoplasma bovis* from buffaloes with reproductive disorders in buffalo oviduct organ culture. *Indian Veterinary Journal*. v. 73, p. 1109-1112. 1996.

SMITS, B.; ROSENDAL, S.; RUHNKE, H.L.; PLANTE, C.; O'BRIEN, P.J.; MILLER, R.B. Effects of *Ureaplasma diversum* on bovine oviductal explants: Quantitative measurement using a calmodulin assay. *Canadian Journal of Veterinary Research*. v.58, n.2, p.114–121. 1994.

SOUSA, F. D. N. Detecção de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em sêmen de reprodutores ovinos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. Garanhuns-Pe. 43p. 2013.

THIBIER, M. Identified and unidentified challenges for reproductive biotechnologies regarding infectious diseases in animal and public health. *Theriogenology*, London. n.56, p. 1465-1461. 2001.

TILLARD, E.; HUMBLLOT, P.; FAYE, B.; LECOMTE, P.; DOHOO, I.; BOCQUIER, F. Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and subtropical conditions. *Theriogenology*. v. 69, n. 4, p. 443–457. 2008.

TIMENETSKY, J.; BUZINHANI, M. *Mollicutes*: Um desafio ao conhecimento bacteriano. *Revista Microbiologia em Foco*. v. 2, n. 8, p. 04-09. 2008.

TRAMUTA, C.; LACERENZA, D.; ZOPPI, S.; GORIA, M.; DONDO, A.; FERROGLIO, E.; NEBBIA P.; ROSATI, S. 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*, v. 23, n. 4, p. 657–64. 2011.

VARGAS, T. P.; BASSUÍNO, D. M.; LORENZO, C.; BOABAID, F. M.; DALTO, A. G. C.; CRUZ, R. A. S.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D. Diagnóstico histopatológico de doenças em búfalos no Rio Grande do sul. In: VII Encontro nacional de diagnóstico veterinário e II encontro internacional de sanidade de animais de produção, 2014. Disponível em: www.ufrb.edu.br/apa/component/phocadownload/.../14-miscelnea?.Acesso em: 15/10/2015.

VIANNA, F.P.; CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E.; CAMPOS, F. R.; TEIXEIRA, S. R.; MIYASHIRO, S. Relato de infertilidade de touros da raça nelore relacionada à presença de *Ureaplasma diversum* e *Histophilus somni*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.71, p. 1-749. 2004.

WAITES, K.B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R.L. *Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens. Clinical Microbiology Reviews.* v. 18, n. 4, p. 757-789. 2005.

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

YAMAGUTI, MAURÍCIO. Isolamento de micoplasma de suínos com problemas respiratórios e tipificação dos isolados pela PFGE e sequenciamento do gene 16S rRNA. **Tese (Doutorado).** Instituto de Ciências da Universidade de São Paulo-SP. 148p. 2009.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

5.1. ARTIGO 1: OCORRÊNCIA DE DNA DE MOLLICUTES NO TRATO GENITAL DE FÊMEAS BUBALINAS (*Bubalus bubalis*) NO ESTADO DE PERNAMBUCO.

(Artigo a ser submetido à Revista Científica de Medicina Veterinária da UFRPE)

(Normas no Anexo1)

1 OCORRÊNCIA DE DNA DE *MOLLICUTES* NO TRATO GENITAL DE FÊMEAS
2 BUBALINAS (*Bubalus bubalis*) NO ESTADO DE PERNAMBUCO

3 (OCCURENCE OF *MOLLICUTES* DNA IN THE GENITAL TREATMENT OF
4 BUBBLY FEMALES (*Bubalus bubalis*) IN THE STATE OF PERNAMBUCO)

5 **Resumo**

6 Objetivou-se neste estudo determinar a ocorrência de DNA de micro-organismos da classe
7 *Mollicutes* no trato genital de fêmeas bubalinas no estado de Pernambuco. Foram
8 analisadas 292 amostras de *swab* vaginal procedentes de búfalas em idade reprodutiva de
9 nove propriedades, distribuídas em cinco municípios. Para a detecção do DNA utilizou-se
10 a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A ocorrência de fêmeas positivas para
11 *Mollicutes* foi 4,8% (14/292). Em relação ao número de propriedades com fêmeas
12 positivas, constatou-se que 44,4% (4/9) das propriedades possuíam, ao menos, uma fêmea
13 infectada por *Mollicutes*. As amostras positivas na PCR foram inoculadas em meios
14 específicos para *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp., principais gêneros envolvidos em
15 problemas reprodutivos, mas não houve crescimento de colônias características. Conclui-se
16 que DNA de micro-organismos da classe *Mollicutes* estão presentes no trato reprodutivo de
17 búfalas no estado de Pernambuco. Apesar da baixa ocorrência, a presença do DNA desses
18 micro-organismos deve ser investigada com o intuito de avaliar se espécies patogênicas
19 para o trato reprodutivo podem estar presentes nestes rebanhos causando possíveis perdas
20 econômicas aos criadores.

21 **Palavras-chave:** Bubalinos; doença reprodutiva; epidemiologia.

22 **Abstract**

23 The objective of this study was to determine the occurrence of DNA from microorganisms
24 of the *Mollicutes* class in the genital tract of buffalo females in the state of Pernambuco.
25 We analyzed 292 vaginal swab samples from buffaloes of reproductive age from nine
26 farms, distributed in five municipalities. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for
27 DNA detection. The occurrence of *Mollicutes* positive females was 4.8% (14/292).
28 Regarding the number of properties with positive females, it was found that 44.4% (4/9) of
29 the properties had at least one female infected with *Mollicutes*. PCR positive samples were
30 inoculated in media specific for *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma* spp., major genera

31 involved in reproductive problems, but there was no growth of characteristic colonies. It is
32 concluded that DNA of microorganisms of the class *Mollicutes* are present in the
33 reproductive tract of buffaloes in the state of Pernambuco. Despite the low occurrence, the
34 presence of the DNA of these microorganisms must be investigated in order to evaluate if
35 species pathogenic to the reproductive tract can be present in these herds causing possible
36 economic losses to the breeders.

37 **Introdução**

38 As doenças reprodutivas ocasionam prejuízos econômicos para a cadeia produtiva
39 animal (Fareed et al., 2015). Pesquisa com búfalos tem demonstrado a presença de
40 problemas reprodutivos congênitos, genéticos e adquiridos, muitos desses levando a
41 consequências como: retenção de placenta, repetição de cio, endometrite, placentite e
42 abortos (Al-Kennany, 2010; Yoo, 2010; Azawi, 2011; Modi et al., 2011).

43 Sabe-se que alguns micro-organismos podem causar direta ou indiretamente
44 distúrbios reprodutivos e que agentes infecciosos são a causa de aborto em cerca de 90%
45 dos casos em animais (Silva et al., 2010; Perumal et al., 2013). Alguns patógenos que
46 acometem o sistema reprodutivo de bovinos já foram relatados em búfalos, tais como:
47 *Brucella* spp., *Leptospira* spp. (Bastianetto, 2009) e *Chlamydophila abortus* (Greco et al.,
48 2007). Porém, outros micro-organismos menos conhecidos como os da classe *Mollicutes*
49 tem sido diagnosticados em bubalinos (Sharma et al., 1996; Marouf et al., 2011).

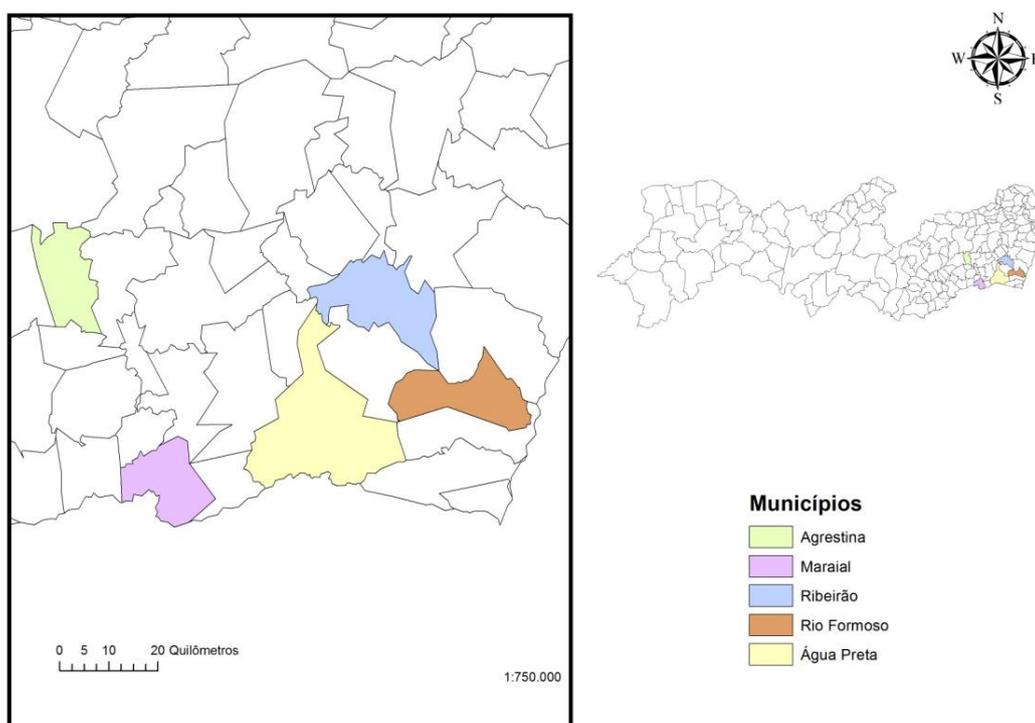
50 Apesar do impacto que a classe *Mollicutes* pode ocasionar na esfera reprodutiva,
51 poucas pesquisas foram realizadas em búfalos no mundo (Sharma et al., 1996; Marouf et
52 al., 2011; Kaur et al., 2015). No Brasil há registros da infecção por micro-organismos da
53 classe *Mollicutes* causando problemas reprodutivos em bovinos em alguns estados, tais
54 como: Paraíba (Santos et al., 2013), São Paulo, Goiás, Santa Catarina (Buzinhani et al.,
55 2007), Alagoas (Oliveira et al., 2005) e Pernambuco (Santos et al., 2015). Entretanto não
56 existem estudos sobre a ocorrência desses micro-organismos no trato reprodutivo de
57 búfalos. Desta forma, objetivou-se com esta pesquisa determinar a ocorrência de DNA de
58 bactérias da classe *Mollicutes* em fêmeas bubalinas no estado de Pernambuco.

59 **Material e Métodos**

60 O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA)
61 da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob Licença nº 043/2016 (Anexo 2).

62 **Área de estudo**

63 Para este estudo foram amostradas por conveniência não probabilística, nove
64 propriedades distribuídas em cinco municípios localizados na região da Mata e Agreste
65 pernambucano: Água Preta (n=2), Maraiial (n=1), Rio Formoso (n=1), Ribeirão (n=4) e
66 Agrestina (n=1), (Figura 1). Nessas regiões estão concentrados os maiores produtores de
67 búfalos do Estado em decorrência das características geográficas e finalidade de produção
68 desses animais.



77 **Coleta das amostras**

78 Foram coletadas 292 amostras de *swab* vaginal de fêmeas em idade reprodutiva, no
79 período de março de 2016 a abril de 2017, sem histórico de problemas reprodutivos e sem
80 sinais clínicos. Os dados de identificação dos animais foram registrados em ficha
81 específica (Apêndice 1), após a assinatura do termo de ciência e livre consentimento pelo
82 proprietário dos animais (Apêndice 2).

83 Para a coleta do material biológico, as fêmeas foram contidas e, posteriormente, foi
84 realizada a higienização da vulva com água e sabão, secagem com papel toalha e
85 desinfecção com álcool (70° GL). Em seguida, *swabs* esterilizados foram friccionados nas
86 paredes internas da vagina para coleta de secreção vaginal e acondicionados em tubos
87 estéreis contendo 3mL de solução salina tamponada com fosfato (pH 7.2) (Nascimento et
88 al., 2005). Os tubos com material biológico foram encaminhados para processamento no
89 laboratório, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

90 No laboratório, as amostras foram divididas em alíquotas de 600µL de volume para
91 realização da extração do DNA com kit comercial Promega® (catálogo A1125), de acordo
92 com o protocolo do fabricante. Para o cultivo e isolamento alíquotas de 500µL foram
93 armazenados em microtubos contendo glicerol na proporção 2:1, homogeneizado em
94 vórtex e armazenados em freezer a -20°C até seu devido processamento.

95 **Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

96 Após a extração do DNA as amostras foram submetidas a PCR com *primers*
97 genéricos (GPO3/MGSO) para detecção dos gêneros pertencentes à classe *Mollicutes*. Os
98 oligonucleotídeos utilizados nesta reação foram MGSO (5'-TGC ACC ATC TGT CAC
99 TCT GTT AAC CTC-3') e GPO3 (5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T -
100 3'), com perfil térmico previamente descrito (Kuppeveld et al., 1992).

101 Cada reação foi constituída de uma mistura de 25µL, contendo 8µL de DNA,
102 *primers* a 30pm, 6,25µL de GoTaq®Green Master Mix (Promega® Corporation, Madison,
103 WI, USA, Ref. M7122) e água ultrapura. O controle positivo utilizado para *Mollicutes* foi a
104 estirpe G12 e como controle negativo foi utilizada água ultrapura.

105 Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese (100 V / 60 min) em gel
106 de agarose a 1,5%. Nessa etapa, foram utilizadas 9µL da reação da PCR genérica, 0,3µL de

107 corante Bluegreen e marcador de peso molecular de 100pb, detectados sob luz ultravioleta
108 e fotodocumentados.

109 **Isolamento e identificação**

110 As amostras positivas na PCR foram submetidas a isolamento e identificação das
111 colônias em meios de cultivos para os principais gêneros encontrados no trato reprodutivo.
112 As alíquotas positivas, acondicionadas em glicerol foram descongeladas e semeadas em
113 meio líquido e placa de Hayflick modificado para *Mycoplasma* spp. e “UB” para
114 *Ureaplasma* spp., de acordo com Whitford et al. (1994) e Razin & Tully (1996),
115 respectivamente. Todas as placas e caldos foram incubados a 37°C em microaerofilia por
116 até 21 dias, sendo as placas examinadas em microscópio estereoscópio diariamente para
117 visualização de colônias característica da classe *Mollicutes*.

118 **Resultados**

119 Observou-se neste estudo uma ocorrência de 4,8% (14/292) de búfalas infectadas
120 por *Mollicutes* no estado de Pernambuco. Em relação ao número de propriedades com
121 animais positivos, constatou-se que 44,4% (4/9) das propriedades possuíam, ao menos, um
122 animal infectado (Tabela 1).

123 As amostras positivas para *Mollicutes* foram cultivadas em meio Hayflick e UB,
124 monitoradas diariamente durante 21 dias, porém não se observou crescimento de colônias
125 características.

126 **Tabela 1.** Distribuição das amostras positivas para a classe *Mollicutes* nos municípios
127 estudados.

Propriedade	N	PCR (positivo)
A	5	4 (80,0%)
B	50	-
C	48	1 (2,1%)
D	21	-
E	50	2 (4,0%)

F	28	7 (25,0%)
G	25	-
H	41	-
I	24	-

128 **Discussão**

129 Este é o primeiro estudo realizado no Brasil sobre a ocorrência de DNA de micro-
 130 organismos da classe *Mollicutes* no sistema reprodutivo de búfalas, existindo, apenas,
 131 relatos em outras espécies, como por exemplo, a bovina. Este registro permite identificar a
 132 ocorrência do DNA da classe *Mollicutes* nas criações bubalinas, uma vez que, em bovinos,
 133 a enfermidade está presente em vários estados do país, como: São Paulo, Goiás, Santa
 134 Catarina (Buzinhani et al., 2007), Paraíba (Santos et al., 2013), Alagoas (Oliveira et al.,
 135 2005) e Pernambuco (Santos et al., 2015).

136 No mundo, são escassos os estudos envolvendo *Mollicutes* em búfalos, o que
 137 dificulta uma avaliação precisa sobre a distribuição desses micro-organismos nos rebanhos
 138 e qual o impacto econômico causado nas produções. Apesar de existirem estudos relatando
 139 vários problemas reprodutivos em búfalos, como, processos inflamatórios infecciosos que
 140 resultam em endometrite, metrite e piometrite, a maioria dos autores não procura
 141 identificar os micro-organismos envolvidos (Ohashi, 2012; Al-Kennany et al., 2010; Modi
 142 et al., 2011; Azawi, 2011; Ribeiro et al., 2016).

143 A ocorrência de *Mollicutes* neste estudo foi 4,8% (14/292). Esse valor foi inferior
 144 ao encontrado por Marouf et al. (2011) que, ao coletar dez amostras de *swab* vaginal de
 145 búfalas no Egito, encontraram 30% (3/10) de amostras positivas para algumas espécies de
 146 *Mollicutes*, sendo 10% (1/10) para *Mycoplasma bovigenitalium*, 10% (1/10) para
 147 *Mycoplasma bovis* e 10% (1/10) para *Mycoplasma* spp. Nesse mesmo estudo, os autores
 148 não mencionam a presença de sinais clínicos nos animais investigados.

149 Esses dados também foram inferiores ao encontrado por Kauret al., (2015), que
 150 coletaram 30 amostras de *swabs* vaginais de bovinos e búfalos com descarga vaginal
 151 purulenta e histórico de abortos, encontrando 30 % (9/30) de amostras positivas para
 152 *Mycoplasma* spp.

153 Um dos fatores que pode explicar a baixa ocorrência de *Mollicutes* nesta pesquisa,
154 é a ausência de sinais clínicos nos animais pesquisados. Não foram observados animais
155 com sinais clínicos durante a coleta e os proprietários informaram que os casos de abortos
156 são raros e que, nestes casos, as búfalas eram eliminadas do rebanho. Essa informação é
157 importante, uma vez que Oliveira Filho et al. (2005), ao pesquisarem *Ureaplasma* spp. em
158 bovinos com repetição de estro no estado de Alagoas, Brasil, observaram que a detecção
159 estava associada à presença de lesões na mucosa vulvovaginal. Observação esta presente
160 também nos estudos realizados por Santos et al. (2013, 2015), que investigaram a
161 ocorrência de *Mollicutes* em rebanhos bovinos com distúrbios reprodutivos com presença
162 de lesões características nos estados da Paraíba e Pernambuco.

163 Outro fator, que pode estar relacionado com a baixa ocorrência da infecção, são as
164 características fisiológicas dos bubalinos, adquiridas durante o seu processo evolutivo, que
165 os tornariam mais resistentes às patologias comumente observadas em bovinos, como
166 infecções no trato reprodutivo e glândula mamária (Bastianetto, 2009; Motta-Giraldo et al,
167 2014).

168 No Brasil, Ribeiro et al. (2016) realizaram uma investigação sobre as principais
169 patologias encontradas em búfalos abatidos em municípios do estado do Amapá. A
170 endometrite foi uma das enfermidades mais encontradas, porém, a causa não foi
171 investigada. A presença de infecções reprodutivas causadas por micro-organismos da
172 classe *Mollicutes* não são de notificação obrigatória, desse modo, na maioria dos países, o
173 teste para a presença de *Mollicutes* não está incluído no exame bacteriano de rotina, o que
174 limita o esclarecimento da real participação desses micro-organismos nas enfermidades
175 reprodutivas.

176 Ao infectarem animais de um rebanho, algumas espécies de *Mollicutes* podem
177 ocasionar distúrbios reprodutivos de evolução lenta, principalmente quando presentes em
178 portadores assintomáticos. Dessa forma, os produtores só conseguem perceber algumas
179 alterações, como diminuição na taxa de concepção, quando um número maior de animais
180 já estão infectados. Nos casos de animais que não são manejados frequentemente, as lesões
181 e secreções presentes na mucosa muco-vaginal podem não ser observadas e, por serem
182 muitas vezes auto-limitantes, passam despercebidas. Na maioria das propriedades
183 pesquisadas 66,66% (6/9), os animais eram criados em sistema extensivo e, em muitas, não
184 existiam bretes apropriados para a avaliação ginecológica frequente desses animais.

185 Em relação ao número de propriedades com animais positivos, constatou-se que
186 44,4% (4/9) das propriedades possuíam ao menos um animal infectado. Essa ocorrência
187 pode estar relacionada à forma como atividade da bubalinocultura é realizada no estado de
188 Pernambuco. A criação de búfalos ainda é uma atividade restrita no estado de Pernambuco,
189 onde existem poucas criações e a compra de animais ocorre pela aquisição em outros
190 estados ou entre produtores da mesma região o que pode contribuir para a transmissão do
191 agente, uma vez que não são realizadas quarentena ou exames para as principais
192 enfermidades reprodutivas.

193 As amostras positivas na PCR foram cultivadas em meios específicos, mas não
194 houve crescimento de colônias características. Esse resultado pode ter sido influenciado
195 pela inviabilidade das bactérias presentes nas amostras durante o armazenamento e
196 reativação. Essa limitação não ocorre na PCR, na qual é possível a detecção do agente,
197 mesmo quando não é viável para o isolamento, o que torna esse método mais sensível
198 (Cardoso & Vasconcellos, 2004).

199 Apesar das dificuldades no diagnóstico, ele deve ser incentivado e incluído nos
200 exames de rotina, principalmente, em propriedades com problemas reprodutivos.
201 Atualmente, técnicas mais efetivas para diagnóstico de várias espécies de *Mollicutes*
202 podem ser realizadas (Parker, 2017) e, até mesmo PCR multiplex para vários agentes
203 infecciosos distintos, podem ser utilizadas na tentativa de diminuir os custos e aumentar a
204 rapidez no diagnóstico (Kaur et al., 2015). O conhecimento da ocorrência de problemas
205 reprodutivos, em um determinado rebanho, é fundamental para embasar os profissionais
206 sobre a prevenção e controle dos problemas relacionados à fertilidade/infertilidade,
207 propiciando, também, o conhecimento necessário para a implantação de um bom manejo
208 reprodutivo (Ohashi et al., 2012).

209 **Conclusão**

210 Conclui-se que DNA do micro-organismos da classe *Mollicutes* estão presentes no
211 trato reprodutivo de búfalas no estado de Pernambuco. Apesar da baixa ocorrência, a
212 presença desses micro-organismos deve ser investigada com o intuito de avaliar, se
213 espécies patogênicas para o trato reprodutivo estão presentes nestes rebanhos causando
214 possíveis perdas econômicas aos criadores.

215 **Conflitos de Interesse**

216 Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

217 **Comitê de Ética**

218 O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da
219 Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob Licença nº 043/2016.

220 **Referências**

- 221 Al-Kennany, E.R.; Rahawy, M.A.; Al-Allaf, E.S. Clinical and pathological study of
222 retained placenta in Iraqi buffaloes. **Journal of Veterinary Medical Science**, 3: 96-11,
223 2010.
- 224 Azawi, O.I.; Ali, A.J. A study on the prevalence of some pathological abnormalities of the
225 uterus diagnosed at post mortem of buffaloes in Mosul. **Buffalo Bulletin**, 30: 67-71, 2011.
- 226 Bastianetto, E.; Leite, R. C. **Doenças infecciosas em búfalos**, 2009. Disponível em:
227 <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/viewFile/7665/5438>. Acesso em: 15/05/2017.
- 228 Buzinhani, M.; Metiffogo, E.; Timenetsky, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma*
229 *diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina**
230 **Veterinária e Zootecnia**, 59: 1368-1375, 2007.
- 231 Cardoso, M. V.; Vasconcellos, S. A. Importância das micoplasmoses na fertilidade de
232 touros – artigo de revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**, 71: 257-265, 2004.
- 233 Fareed, S. K.; Memon, K. H.; Kachiwal, A. B.; Azhar, S.; Brula, M. I.; HASAN, M.; ALI,
234 M.; KHAN, T. A. Prevalence and economic losses of reproductive disorders and mastitis
235 in buffaloes at Karachi, Pakistan. **Indian Journal Of Animal Research**, 01-04, 2006.
- 236 Greco, G.; D’Abramo, M.; Campanile, G.; Di Palo, R.; Corrente, M.; Buonavoglia, D.
237 Reproductive disorders induced by *Chlamydophila* spp. Infections in an Italian mediterranean
238 buffalo (*bubalus bubalis*) herd. **Journal Animal Science**, 6: 877-880, 2007.
- 239 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**.
240 Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadoresagropecuario.pdf>>.
241 Acesso em: 15/10/2015.

- 242 Kaur, P.; Sharma, N S.; Arora, A. K. Development of a multiplex PCR assay for detection
243 of different bacterial pathogens associated with reproductive disorders in cattle and
244 buffalo. **Indian Journal of Animal Sciences**, 85: 1306–1310, 2015.
- 245 Kuppeveld, V. F. J. M.; Logt, J. T. M.; Angulo, A. F.; Zoest, M. J.; Quint, W. G. V.; Nies-
246 ters, H. G. M.; Galama, J. M. D.; Melchers, W. J. G. Genus- and species-specific
247 identification of Mycoplasmas by 16 rRNA amplification. **Applied Environmental**
248 **Microbiology**, 58: 2606-2615, 1992.
- 249 Marouf, S.A.; Mohamed, KH.F.; El-Jakee, J. Detection of mycoplasma bovis and
250 Mycoplasma bovinogenitalium in Cattle and Buffalo in Egypt using Dot ELISA and PCR
251 with Anti-Microbial Trials. **European Journal of Biological Sciences**, 3: 01-08, 2011.
- 252 Modi, L. C.; Patel, P. A.; Patel, S.P.; Patel, G.G.; Joshi, A.H.; Suthar, D.N. Prevalence of
253 Reproductive Problems in Buffalo in Mehsana Milk-Shed Area of Gujarat. **Revista**
254 **IJAVMS**, 5: 424-428, 2011.
- 255 Motta-Giraldo, J. L; Abeledo-García, M. A; Waltero-García, I; Miranda, I; Campos-
256 Pipaon, R. Principales trastornos reproductivos en búfalas y vacas en hatos mixtos y de una
257 especie en el departamento de Caquetá, Colombia. **Revista de la Facultad de Medicina**
258 **Veterinaria y de Zootecnia**, 61, 228-240, 2014.
- 259 Nascimento, M. D. G. F.; Freitas D'Angelis, F. H.; Nascimento, E. R.; Resende, A. O.
260 Envolvimento de micoplasmas em vacas com distúrbios reprodutivos. **Acta Scientiae**
261 **Veterinariae**, 33, 195–199, 2005.
- 262 Ohashi, O; Miranda, M. S.; Santos, S. D.; Cordeiro, M. S.; Costa, N. N.; Silva, T. V.
263 Distúrbios reprodutivos do rebanho bubalino nacional. **Ciência Animal**, 22: 171-187.
264 2012.
- 265 Oliveira Filho, B.D.; Porto, R.N.G.; Gambarini, M.L.; Kunz, T.L.; Ferraz, H.T.; Viu,
266 M.A.O.; Lopes, D.T.; Sousa, A.P.F. Isolamento do *Ureaplasma diversum* em muco
267 vulvovaginal de vacas leiteiras repetidoras de estro no estado de Alagoas – Brasil.
268 **Archives of Veterinary Science**, 10, 151-156, 2005.
- 269 Parker, A.M.; House, J.K.; Hazelton, M.S; Bosward, K.L; Sheehy, P.A. Comparison of
270 culture and a multiplex probe PCR for identifying *Mycoplasma* species in bovine milk,
271 semen and swab samples. **Plos One**, 12, 1-14, 2017.

- 272 Perumal, P.; Kiran, K. T.; Srivastava, S.K. Infectious causes of infertility in Buffalo bull
273 (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Bulletin**, 32: 71-96, 2013.
- 274 Razin, S., & Tully, J. G. **Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasma**. ed.
275 2. California: Academic Press, 1996.
- 276 Ribeiro, H. F. L.; Mourão, F. R. P.; Monteiro, F. J. C.; Rolim Filho, S. T.; Vale, W. G.
277 Diagnosis of investigative pathology in the genital tract of buffaloes raised extensively in
278 the State of Amapá, Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 38:
279 358-364, 2016.
- 280 Santos, S. B.; Pinheiro-Júnior, J. W.; Mota, A. R.; Santos, A. S.; Alves, B. H.; Oliveira, J.;
281 Silva, L. B.G.; Mota, R. A. Recovery of *Mollicutes* from the reproductive tract of dairy
282 cattle in the state of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35: 491–496,
283 2015.
- 284 Santos, S. B.; Pinheiro-Júnior, J. W.; Oliveira, A. A.; Mota, A. D. R.; De Oliveira, J. M.
285 B.; Veras, G. A.; Nascimento, E. R.; Mota, R. A. Ocorrência de mollicutes e *Ureaplasma*
286 spp. em surto de doença reprodutiva em rebanho bovino no estado da Paraíba. **Pesquisa**
287 **Veterinária Brasileira**, 33: 315–318, 2013.
- 288 Sharma, V.; Dhaneasar, N. D.; Mehra, K. N. Pathogenicity of *Mycoplasma*
289 *bovinogenitalium* from Buffaloes with Reproductive Disorders in Buffalo Oviduct Organ
290 culture. **Indian Journal of Animal Sciences**, 73: 1109-1112, 1996.
- 291 Silva, T. M. A.; Oliviera, R. G.; Mol, J. P. S; Xavier, M. N.; Paixao, T. A.; Cortez,
292 A.;Heinemann, M.; Richtzenhain, L. J.; Lage, A. P.; Santos, R. L. Etiological diagnosis of
293 bovine infectious abortion by PCR. **Ciência Rural**, 39: 63– 70, 2009.
- 294 Whitford H.W.; R. Osenbusch, R. F.; Lauerman, L. H. **Mycoplasmosis in Animals:**
295 **Laboratory Diagnosis**. Ames: Iowa S.Univ, Press. 1994.
- 296 Yoo, H. S. Infectious causes of reproductive disorders in cattle. **Journal of Reproduction**
297 **and Development**, 56: 53–60, 2010.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Micro-organismos da classe *Mollicutes* podem causar enfermidades reprodutivas que cursam com grandes transtornos e perdas econômicas. No estado de Pernambuco, ficou comprovada a presença desses micro-organismos no trato reprodutivo de búfalas pela presença de seu DNA em secreções vaginais de animais sem sinais clínicos e históricos de problemas reprodutivos. Novas pesquisas devem ser desenvolvidas para avaliar se existe a presença de espécies que atuam na ocorrência de doenças reprodutivas que culminam com vulvovaginite granular, endometrite, repetição de estro e aborto.

Exames para a detecção de micoplasmas devem ser incluídos na rotina laboratorial de amostras clínicas, assim como médicos veterinários devem ser informados e capacitados para o diagnóstico dessas infecções. Os fatores de riscos e os prejuízos econômicos devem ser avaliados e, com isso, medidas de controle e prevenção podem ser implementadas nos rebanhos.

ANEXOS

ANEXO 1

Diretrizes para Autores

Informações Gerais

A revista Medicina Veterinária (UFRPE) do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com publicação trimestral, tem o objetivo de divulgar manuscritos originais em forma de artigo científico, artigo de revisão, relato de caso e comunicação breve nas áreas de Medicina Veterinária, Zootecnia, Ciências Biológicas e áreas correlatas. Os manuscritos deverão ser destinados com exclusividade. A revista é indexada nas fontes: **AGRIS, CAB Abstracts, Latindex, Web of Science e Web of Science – Science Index Expanded.**

Os artigos enviados pelos autores deverão estar devidamente formatados conforme as normas de instruções aos autores vigentes desse periódico. Os artigos encaminhados fora das normas vigentes da revista serão automaticamente devolvidos para adequação.

O Artigo Científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key-words; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão ou Resultados e Discussão; Conclusão (opcional); Conflito de Interesse; Comitê de Ética; Agradecimentos e Referências.

O Artigo de Revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key-words; Introdução; Desenvolvimento (podem ser utilizados subtítulos); Considerações Finais e Referências.

A Comunicação Breve consiste em um artigo curto que descreva observações experimentais relevantes e que não justifiquem ainda sua publicação como artigo científico completo. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key-words; Texto sem divisão das seções, mas contendo Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão; Conflito de Interesse; Comitê de Ética; Agradecimentos e Referências.

O Relato de Caso consiste na descrição de casos que incluam observações clínicas ou que representem originalidade de um diagnóstico ou tratamento, ou ainda que ilustre situações

pouco frequentes. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key-words; Introdução; Descrição do Caso; Discussão; Conclusão (opcional); Conflito de Interesse; Agradecimentos e Referências.

Os trabalhos, em geral, podem ser redigidos nos idiomas Português ou Inglês e devem ser preparados no Microsoft, Word para os textos e Excel para os gráficos.

Os conceitos e opiniões no manuscrito são de exclusiva responsabilidade dos autores e não refletem, necessariamente, a opinião do Comitê Editorial da revista.

Por questões de atualização e migração para a nova Plataforma de Periódicos da UFRPE, os artigos científicos da revista Medicina Veterinária (UFRPE) deverão ser, momentaneamente, enviados para o e-mail: revmedvet@ufrpe.br

Preparação do Manuscrito

O texto deverá ser digitado no tamanho do papel A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 2,0 (espaço duplo), margens superior e esquerda de 3,0cm, inferior e direita de 2,0cm, com linhas numeradas (numeração contínua). O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para artigo de revisão e 12 para relato de caso e comunicação breve. Tabelas, gráficos e demais figuras devem ser incluídos após as referências e não serão consideradas nesse número total de páginas.

O título deverá ser redigido em português acompanhado de tradução em inglês, logo abaixo e entre parênteses. Em caso de ser redigido em inglês, o título em português será colocado logo abaixo e entre parênteses.

Os nomes dos autores deverão ser escritos por completo com o último nome em negrito. Deverão ser colocados abaixo do título, um ao lado do outro separados por vírgula, seguidos de números sobrescritos, os quais serão repetidos imediatamente abaixo dos nomes para indicar afiliação (departamento, instituição, cidade, estado e país) e indicação com símbolo de asterisco (*) do autor para correspondência. O e-mail do autor para correspondência deve ser colocado imediatamente após a filiação.

O **Resumo** e o **Abstract** deverão conter no máximo 250 palavras, incluindo introdução (opcional), objetivo(s), material e métodos, resultados e conclusão. **Palavras-chaves:** no

máximo cinco, separadas por ponto e vírgula, devendo-se evitar a repetição de palavras presentes no título.

A Introdução deverá conter explanação concisa, na qual são estabelecidos, de forma breve e contextualizada, o problema, a relevância, a justificativa e os objetivos do trabalho.

O Material e Métodos deverá citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos utilizados e análise estatística ou referenciar corretamente os métodos já publicados.

Os Resultados devem ser apresentados de forma clara e objetiva, podendo-se utilizar tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor.

A Discussão deverá basear-se nos resultados obtidos no trabalho. É importante ressaltar que os dados sejam discutidos e não simplesmente comparados com dados de outros autores.

A Conclusão ou **Considerações Finais** deverão ser redigidas no “tempo presente do verbo” e estarem fundamentadas nos resultados da pesquisa, sem incluir informações presentes na revisão de literatura e discussão.

As Tabelas e Figuras que já tenham sido publicadas devem ser devidamente referenciadas e conter, abaixo da legenda, a fonte (autor e data).

a) Tabela: conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico. O título da tabela deve ser escrito na parte superior da mesma.

b) Figura: qualquer ilustração, desenho, fotografia, gráfico, fluxograma ou esquema. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico. O título da figura deve ser escrito na parte inferior da mesma. As figuras devem ser enviadas em formato tiff com ao menos 800dpi.

O Conflito de Interesse deverá ser incluindo após a discussão ou conclusão. Os autores devem divulgar quaisquer relações financeiras e pessoais com outras pessoas ou

organizações que poderiam indevidamente influenciar o seu trabalho. Exemplos de potenciais conflitos de interesse incluem o emprego, consultorias, propriedade de ações, honorários, testemunhos de especialistas pagos ou financiamento direto ou indireto. Se não se aplicar ao artigo, sugere-se redigir a seguinte frase: Os autores declaram não existir conflito de interesse.

O Comitê de Ética deverá ser incluído no artigo científico e comunicação breve, após o conflito de interesse, constando o número do parecer da comissão de Ética do Uso de Animais de Experimentação, confirmando sua aprovação. No caso da pesquisa que foi realizada com animais silvestres no Brasil, deve-se acrescentar o número da licença do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O(s) parecer(es) deverá(ão) ser enviado(s) obrigatoriamente por e-mail (revmedvet@ufrpe.br) juntamente com o artigo. Sugere-se redigir a seguinte frase: o projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do(a) **nome da instituição**, sob o número **1111/1111**.

Os Agradecimentos (opcional) devem ser incluídos imediatamente após o item comitê de ética e devem ser expressos de maneira concisa.

As Referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Quando houver mais de uma referência de um mesmo autor, deve-se usar a ordem cronológica.

As citações dos autores no texto deverão ser feitas conforme os exemplos que seguem:

Esses resultados estão de acordo com os reportados por Mota e Alves (2001) e Weppert et al. (2005), como uma má formação congênita (Tudury, 2003; Coelho et al., 2004; Monteiro e Almeida, 2005).

Se o mesmo autor tiver mais de um trabalho publicado no mesmo ano, utilizar letras minúsculas após o ano de publicação (tanto na citação no texto, quanto na lista de referências), conforme exemplo: (Teixeira et al., 2016a; Teixeira et al., 2016b).

As citações dos autores nas referências deverão ser colocadas no final do artigo. As referências devem ser ordenadas alfabeticamente.

As normas para citações e referências foram elaboradas, com adaptações, do estilo Vancouver. Por favor, siga os exemplos abaixo:

Citação de livro:

(autor(es) / título: subtítulo, se houver / edição / cidade da publicação / editora / ano / total de páginas)

Austin, C.R.; Short, F.R.S. **Reproduction in mammals: hormonal control of reproduction**. 2nd ed. Cambridge: University Press, 1988. v.3, 244p.

Willemse, T. **Dermatologia clínica de cães e gatos: guia para o diagnóstico e terapêutica**. São Paulo: Manole, 2002. 143p.

Capítulo de livro com autoria:

(autor(es) do capítulo / título do capítulo: subtítulo, se houver / In: / autor(es) da obra / título da obra: subtítulo, se houver / edição / cidade da publicação / editora / ano / página inicial-final do capítulo)

Lima, P.F.; Paes Barreto, M.B.; Coletto, Z.F. Biopsia e esfregaço vaginal como instrumentos para viabilizar o diagnóstico de gestação. In: Santos, M.H.B.; Oliveira, M.A.L.; Lima, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.35-40.

Santos, M.H.B.; Oliveira, M.A.L.; Lima, P.F. Diagnóstico de gestação. In: _____. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.117-136. (Quando o autor do livro é também autor do capítulo).

Capítulo de livro sem autoria:

Nesses casos subentende-se que o autor do capítulo é o mesmo autor do livro.

Almeida, J.M. Teratologia: as más-formações congênicas e os fatores que as ocasionam. In: _____. **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.65-66.

Artigo completo:

(autor(es) do artigo / título do artigo / nome do periódico / volume / número / página inicial-final / ano)

Andrade, J.C.O.; Oliveira, M.A.L.; Lima, P.F.; Santos Filho, A.S.; Pina, V.M.R. Use of steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, 69(1): 9-14, 2002.

Alves, J.D.; Oliveira, M.A.L.; Lima, P.F.; Caldas, J.G.L.; Santos Filho, A.S.; Barreto, M.B.P. High concentrations of FSH-p on the in vitro maturation of *Bos indicus* oocytes. **Ciência Rural**, 31(5): 645-649, 2001.

Artigo não publicado: (deve ser evitado)

Ferreira-Silva, J.C.; Basto, S.R.L.; Tenório Filho, F.; Moura, M.T.; Silva Filho, M.L.; Oliveira, M.A.L. Reproductive performance of postpartum ewes treated with insulin or progesterone hormones in association with ram effect. **Reproduction in Domestic Animals**, 2017a. doi: 10.1111/rda.12956. (aceito com doi).

Ferreira-Silva, J.C.; Moura, M.T.; Silva, T.D.; Oliveira, L.R.S.; Chiamenti, A.; Freitas, V.J.F.; Oliveira, M.A.L. Full-term potential of goat in vitro produced embryos after different cryopreservation methods. **Cryobiology**. 2017b. (aceito).

Será considerado no prelo, o artigo que já estiver sendo referenciado com o volume, número de páginas e ano de publicação.

Documentos eletrônicos:

(Nome(s) do(s) autor(es), instituição ou órgão governamental* / título / publicação / endereço eletrônico / data de acesso).

*Nota: Quando se tratar de órgãos governamentais da administração (Ministérios, Secretarias e outros) entrar pelo nome geográfico em caixa alta (país, estado ou município), considerando a subordinação hierárquica, quando houver.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 62, de 29 de dezembro de 2011.** Disponível em: <http://www.leitedascrianças.pr.gov.br/arquivos/File/legislacao/IN62_2011_MAPA.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2017.

A revista Medicina Veterinária (UFRPE) não aceita a citação de trabalhos apresentados em eventos científicos (anais de eventos de qualquer natureza), trabalhos de monografias, dissertações de mestrado, teses de doutorado, bem como informações verbais ou similar.

As dúvidas devem ser direcionadas ao Comitê Editorial da revista Medicina Veterinária (UFRPE) através do e-mail: revmedvet@ufrpe.br

Revisão em: 30/05/2017.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
2. O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.
3. URLs para as referências foram informadas quando possível.
4. O texto está em espaço duplo; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado em nomes científicos (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.
6. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ANEXO 2

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



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	043/2016
Número do processo	23082.003287/2016
Data de emissão da licença	02 de Maio de 2016
Título do Projeto	Investigação epidemiológica da infecção por <i>Mycoplasmataceae</i> em búfalos no estado de Pernambuco..
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	José Wilton Pinheiro Júnior
Colaboradores	Grasiene de Meneses Silva; Sandra Batista dos Santos; Rinaldo Aparecido Mota; Allison Alves de Macêdo; Jonas de Melo Borges.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Bubalino; total de 346 animais (fêmeas).

Profª. Dra. Marleyne Jbsé Afonso Accioly Lins Amorim
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Profª. Dra. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA

APÊNDICES

APÊNDICE 2

Termo de Declaração de Livre Consentimento



Universidade Federal Rural de Pernambuco

Departamento de Medicina Veterinária

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 **“Investigação Epidemiológica da Infecção por *Mycoplasmataceae* em búfalos no estado de Pernambuco”**, em desenvolvimento no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos do Departamento de Medicina Veterinária, sob a responsabilidade do Professor Dr. José Wilton Pinheiro Júnior.

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: