

FRANCISCO DAVID NASCIMENTO SOUSA

**DETECÇÃO DE *Ureaplasma* spp. E *Mycoplasma agalactiae* PELA
TÉCNICA DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM
SÊMEN DE REPRODUTORES OVINOS**

GARANHUNS

2013

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

FRANCISCO DAVID NASCIMENTO SOUSA

DETECÇÃO DE *Ureaplasma spp.* E *Mycoplasma agalactiae* PELA
TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM
SÊMEN DE REPRODUTORES OVINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes na Unidade Acadêmica de Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior

GARANHUNS

2013
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE
RUMINANTES

DETECÇÃO DE *Ureaplasma* spp. E *Mycoplasma agalactiae* PELA
TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM
SÊMEN DE REPRODUTORES OVINOS

Dissertação elaborada por
FRANCISCO DAVID NASCIMENTO SOUSA

Aprovado em:/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
Presidente da Banca – Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

Prof. Dr. Arildo Pinto da Cunha
Universidade Federal de Minas Gerais

Dra. Sandra Batista dos Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim
Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

Ficha Catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Setorial UFRPE/UAG

S729d Souza, Francisco David Nascimento.
Detecção de Ureaplasma spp. e Mycoplasma
agalactiae pela técnica da reação em cadeia da
polimerase (PCR) em sêmen de reprodutores ovinos
/Francisco David Nascimento Sousa. - Garanhuns,
2013.
43 f.

CDD: 636.30852

1. Reprodução animal
 2. Pequenos ruminantes
 3. Mollicutes
 4. PCR
- I. Pinheiro Junior, José Wilton
 - II. Título

DEDICATÓRIA

A Deus, que em sua infinita bondade sempre nos mostra o caminho correto e nos concede o uso do livre arbítrio, a mais perfeita relação democrática da qual tenho conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha imensa gratidão pelo presente da vida, por ter presenteado meu corpo com um espírito tão cheio de conflitos e inquieto. Por me permitir o discernimento rápido daquilo que vai ser útil no meu processo evolutivo e também por mostrar com justificativas claras aquilo que não me é necessário, embora minha teimosia às vezes seja soberana. Mas já compreendo que vivemos as nossas escolhas e isso já me ajuda bastante.

A minha querida vovó (*Francisca Paula de Souza*), e aos não menos queridos avós maternos *Manoel Francisco do Nascimento* e *Maria Helena do Nascimento (in memorian)*, com quem tive a oportunidade de aprender como um ser humano é capaz de se doar pelo outro. O amor de vocês por todos os netos e a forma acolhedora como sempre os trataram está em minha lembrança e é algo que sempre aquece o meu coração. Fantásticas almas que Deus proporcionou para cobrir de luz e alegria a minha infância.

Aos meus pais, Minha mãe (*Maria de Lourdes do Nascimento*) e ao meu pai (*Francisco Antonio de Souza*). Cada um ao seu modo, sempre demonstrando o seu amor por mim, sendo intensos na forma que cada um compreende o amor para com os filhos. Minha mãe com a sua ternura e companheirismo, sempre disposta a me ajudar e zelar por mim. Meu pai com o qual pareço muito e apesar da distância mantenho longos diálogos em pensamento para que melhoremos um ao outro. Tenham sempre a certeza de que vocês fizeram o melhor que puderam e eu os amo muito. Aos meus irmãos *Iago Sousa*, *Jorge Allende*, *Maria Paula* e *Stephannie Maia*, pela fraternidade e diversão nessa jornada.

A todos os meus tios, tias, primos e primas, que por se tratar de família tão grande, citar nomes seria correr risco de cometer enormes injustiças.

Ao meu orientador Dr. *José Wilton Pinheiro Junior*, pela confiança em mim depositada, por me proporcionar sempre novos desafios durante o mestrado e incentivar o instinto científico, demonstrando sempre muito apego à pesquisa científica e à carreira docente, sendo uma pessoa na qual consigo enxergar os papéis da universidade (ensino, pesquisa e extensão) plenamente cumpridos. Ainda, pela sua compreensão para com a minha jornada dupla. O meu enorme obrigado pelo aprendizado e pela grandiosa colaboração à minha formação profissional.

Aos coordenadores do programa de pós-graduação em sanidade e reprodução de ruminantes UAG-UFRPE, pelo tratamento sempre respeitoso e cordial, e pela grande prestatividade com a qual sempre fui atendido. Meu agradecimento particular à Dra. *Carla Lopes*.

Ao Dr. *Rinaldo Aparecido Mota*, pela disponibilidade e confiança no uso do laboratório de bacterioses dos animais domésticos, meu agradecimento e admiração pela sua enorme dedicação e contribuição à pesquisa veterinária que se desenvolve no nordeste brasileiro.

À Dra. *Erica Moraes*, pela confiança depositada para execução deste trabalho.

À Dra. *Sandra Batista dos Santos* pelas colaborações e pelo compartilhamento de seus conhecimentos em micoplasmologia.

Ao Professor *Daniel Brandespim*, pelas colaborações ao trabalho e por elucidar dúvidas pertinentes à epidemiologia.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em sanidade e reprodução de ruminantes da UAG/UFRPE que colaboraram para a conclusão dessa etapa através dos conhecimentos compartilhados através das discussões ao longo das disciplinas cursadas. Agradecimento especial ao Dr. *José Augusto Bastos Afonso* e ao professor *Gustavo Ferrer*.

Aos colegas que estiveram sob a mesma orientação que eu, *Acidalia Claudino*, *Junior Mario Baltazar* e *Gislaine Raquel* pela troca de conhecimentos e interatividade.

À ADEAL e à ADAGRO pela forma compreensiva com a qual fui tratado para que pudesse cumprir as atividades durante a pós-graduação.

Aos colegas com quem tive a satisfação de convivência durante o processamento das amostras no laboratório de bacterioses da UFRPE, *Pomy Kim*, *Renata Pimentel*, *Luana*, *André Santos*, *André Mota*, *Bruno*, *Maina Almeida*, *Débora Viegas*, *Pedro Paulo*, *Orestes*, *Givanildo* e *Pollyanne*. Meu agradecimento pela colaboração, ainda que nas horas e dias mais adversos.

Aos meus amigos de lutas diárias nas atividades da defesa agropecuária. Amigos da ADEAL: *Adauto Mariz*, *Alexandro Nunes*, *André Sandes*, *Otto Portela*, *Lara Cavalcanti*, *Marcio de Jesus*, *Maria Lacerda*, *Ana Rosa*, *Jaqueline de Almeida*, *José Arnaldo*, *Josean Leite*, *Kerginaldo Lopes*, *Suzanny Martins* e a todos que compõem a família alagoana do Chico, incluindo-se aí *Ivania Albuquerque*, *Laura Queiroz*, *Deja*, *Aline* e *Gustavo Albuquerque*, *Luiz Otavio*, *Antonio Rosendo*, *José Francisco*, *George Gomes* e *José Nelson*. Aos amigos da ADAGRO: meus cumpadres, *Paula Regina* e *Gabriel*

Martins, Marcelo Magnata, Manoel Eugenio, Wellington Regis e Alessandra Silvestre, Jose Lopes Junior, Clênia Lucia Pacas e Eliane Bassetto, Luis Carlos, Wilson de Souza, João Vilaça, Djalma Rosendo, Alessandro Silva, Eduardo Brum, Fabio Lyra, Marcio José e Hélder Holanda. Com esses, além do vínculo profissional, tive também a oportunidade de cultivar grandes amizades e sou grato a todos por isso.

Aos meus eternos amigos da graduação na UFERSA, sempre presentes no meu lembrar: professores *Jael Soares, Jean Berg, Regina Dias, Sidnei Sakamoto, Everardo Praça, José Fernando Gomes de Albuquerque e Alessandro Leite;* e os integrantes da XV turma de medicina veterinária: *Regiana Lage, Ingrid Silva, Liane Seabra, Keilla Moreira, Maria Oliveira, Diôgo Lopes, Anderson Gurgel, Karemerson Garcia, Francisco das Chagas, Almir Maia Junior, João Paulo Araujo, Debora Villar e Danielle Santiago* Todos deram sua colaboração para um momento de indescritível emoção em minha vida. Saudades do núcleo potiguar da novela!

À Dra. *Clenia Pacas*, pelos momentos de descontração e positividade mediante os momentos de dificuldades do cotidiano sempre me trazendo uma palavra amiga e uma ótica mais compreensiva das coisas.

Aos amigos que estão sempre por perto nas horas mais difíceis e também nas mais fáceis: *Paula Regina, Alessandra Silvestre, Alexandro Nunes, Marcelo Magnata, Giselda Barros, Rafael Otaviano, Elâne Rafaella, Cleo Marcelino, Elisabeth Hortencio.* Minha gratidão pela dedicação, eu sou um amigo que consome muito tempo, eu sei. Obrigado!

Aos amigos de Mossoró com quem estreitei contato ao longo da pós-graduação nas atividades em Recife: *Agenor, Laerte, Miquelângelo e Edivan.*

Finalmente, agradeço a todos os cidadãos brasileiros, que através de suas contribuições me proporcionaram o acesso a uma educação superior pública, gratuita e de qualidade. E ainda espero por um Brasil mais igual em oportunidades para todos os brasileiros.

“Voltei Recife, a PCR que me trouxe pelo braço, Quero ver os Micoplasmas e Ureaplasmas se revelando, bater uma foto e outras, e correr pro abraço”. Paródia de um frevo

RESUMO

Objetivou-se com este estudo detectar o DNA de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em sêmen de ovinos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram analisadas 240 amostras, sendo 120 de sêmen congelado obtidas de centrais de inseminação artificial (IA) e 120 de sêmen fresco de reprodutores ovinos provenientes dos estados de Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte coletados durante a realização da Exposição nordestina de animais em Recife, PE. Após a colheita das amostras, foram realizadas a extração de DNA e detecção de DNA genômico dos agentes estudados. Pela primeira vez no Brasil, foi detectada a presença dos agentes *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em amostras de sêmen congelado da espécie ovina. Nas amostras de sêmen congelado, detectou-se DNA de *Ureaplasma* spp. em 2,5% (3/120) e de *Mycoplasma agalactiae* em 4,2% (5/120). Para o sêmen fresco, detectou-se DNA de *Ureaplasma* spp. em 8,3% (10/120) das amostras analisadas e 6,7% (8/120) de *Mycoplasma agalactiae*. Ao avaliar a associação entre o tipo de sêmen e a detecção de DNA para *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae*, observou-se associação significativa somente para *Ureaplasma* spp. ($p= 0,046$), sendo mais comum a detecção deste micro-organismo em amostras de sêmen fresco. Foram observadas ainda, amostras positivas para *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* provenientes dos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Todas as amostras oriundas dos estados de Alagoas e do Ceará obtiveram resultados negativos. Diante dos resultados obtidos neste estudo, constata-se a presença de DNA destes micro-organismos em sêmen de reprodutores ovinos. Desta forma, sugere-se que técnicas para detecção desses agentes sejam utilizadas em centrais de inseminação e em reprodutores ovinos com alto potencial genético, maximizando a eficiência da prática na reprodução de ovinos, evitando a disseminação destes patógenos.

Palavras-chave: *Mollicutes*, pequenos ruminantes, PCR.

ABSTRACT

The objective of this study was to detect the DNA of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma agalactiae* in sheep semen by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). Were analyzed 240 samples, 120 frozen semen obtained from central artificial insemination (AI) and 120 fresh semen of breeding sheep from the states of Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco and Rio Grande do Norte collected during the Northeastern Exposure animals in Recife. After collection of the samples were carried out DNA extraction and detection of genomic DNA of the agents studied. For the first time in Brazil, was detected the presence of agents *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma agalactiae* in samples of frozen semen of sheep. Samples of frozen semen, DNA was detected *Ureaplasma* spp. in 2.5% (3/120) and *Mycoplasma agalactiae* of 4.2% (5/120). For fresh semen was detected DNA of *Ureaplasma* spp. in 8.3% (10/120) of the samples and 6.7% (8/120) of *Mycoplasma agalactiae*. When evaluating the association between the type of semen and DNA detection for *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma agalactiae*, a significant association was observed only for *Ureaplasma* spp. ($p = 0.046$), being more common detection of this micro-organism in fresh semen samples. We also observed positive samples *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma agalactiae* from the states of Paraíba, Pernambuco and Rio Grande do Norte. All samples from the states of Alagoas and Ceará results were negative. Results obtained in this study, there is the presence of DNA of these microorganisms in semen of the breedings sheep. Thus, it is suggested that techniques for detecting these agents must be used in insemination centers and breeding sheep with high genetic potential to maximize the efficiency of the sheep reproduction by preventing the spread of these pathogens.

Keywords: Mollicutes, small ruminants, PCR.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Detecção de DNA de <i>Ureaplasma</i> spp. e <i>Mycoplasma agalactiae</i> em amostras de sêmen ovino procedentes de centrais de inseminação artificial e exposição de animais.....	37
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Geral.....	15
2.2. Específicos.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1. Caracterização do agente etiológico.....	16
3.2. Micoplasmoses em ovinos.....	17
3.3 Mecanismos de patogenicidade dos micoplasmas.....	19
3.4. Diagnóstico.....	21
3.5. Vigilância epidemiológica e controle.....	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
5. ARTIGO CIENTÍFICO	30
Detecção de <i>Ureaplasma spp.</i> e <i>Mycoplasma agalactiae</i> pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em sêmen de reprodutores ovinos	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
7. ANEXOS	39
Normas da Revista Pesquisa Veterinária.....	40
Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	41

1. INTRODUÇÃO

O rebanho ovino brasileiro está estimado em 17,3 milhões de cabeças. A sua maior concentração encontra-se na região Nordeste com aproximadamente 9,85 milhões de cabeças (56,72%), seguido da região Sul com 4,88 milhões de cabeças (28,11%), Centro-Oeste com 1,26 milhões de cabeças (7,3%), Sudeste com 781.874 cabeças (4,15%) e a região Norte com 586.237 cabeças (3,37%) (IBGE, 2011).

A ovinocultura é uma atividade de importância econômico-social, particularmente nos países em que possuem regiões de clima semi-árido (ELLIS, 1996). Nestas regiões, o segmento da sociedade que tradicionalmente é envolvida no processo produtivo de pequenos ruminantes apresenta variados níveis de complexidade e multiplicidade de objetivos. No Brasil, a produção de ovinos é tradicionalmente explorada com pouca tecnologia (WANDER et al., 2003).

O manejo reprodutivo e a compreensão dos problemas relacionados ao mesmo necessitam entendimento em diversas esferas: nutricional, genética, falhas no manejo higiênico-sanitário, número de reprodutores, cruzamento, idade das fêmeas, problemas hormonais e o controle de doenças infecciosas da esfera reprodutiva (EMPARN, 2006).

O uso da inseminação artificial tornou possível o intercâmbio de material genético de melhor qualidade e com essa tecnologia, uma melhora da produção de leite e carne, tanto ao nível nacional como internacional. As possibilidades da contaminação do sêmen por agentes patogênicos e sua possível disseminação, converteram-se em uma das principais preocupações para criadores e autoridades sanitárias dos países onde se emprega essa tecnologia (AFSHAR; EAGLESOME, 1990).

Os micoplasmas incluem-se entre os agentes causadores de enfermidades no trato reprodutivo dos animais (CARDOSO et al., 2000). O termo *Mollicutes* é utilizado genericamente para designar cerca de 200 espécies desta classe, composta por cinco ordens, seis famílias e 14 gêneros, sendo que nos gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Acholeplasma* encontram-se a maioria das espécies que habitam os animais como comensais, saprófitos ou patógenos (RAZIN, 2002).

A associação entre *Mollicutes* e distúrbios reprodutivos em caprinos e ovinos foi relatada por alguns autores (KOTANI et al., 1980; NICHOLAS et al., 1999). Sendo relacionados com casos de vulvovaginites e outras desordens reprodutivas na Austrália,

França e Nigéria (NICHOLAS et al., 1999). Nesse contexto, merecem destaque infecções por *Mycoplasma* subsp. *mycoides*, *M. bovis genitalium*, *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. arginini*, *M. alkalescens* e *Acholeplasma* spp. (KAPOOR et al., 1984; AK et al., 1995; NICHOLAS et al., 1999)

As bactérias do gênero *Mycoplasma* devem ser investigadas uma vez que acarretam prejuízos econômicos e também por se tratarem de agentes passíveis de serem transmitidos pela inseminação artificial (THIBIER; GUERIN, 2000).

No Brasil, existem poucos estudos que avaliam o envolvimento dos *Mollicutes* às alterações reprodutivas na espécie ovina, esse tema ainda deve ser mais explorado (RIZZO et al., 2011). Gregory et al. (2012) isolaram *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. de amostras de sêmen fresco de ovinos da região de Piedade, SP. Dados sobre detecção de ureaplasma em sêmen congelado são escassos, especialmente no Brasil (MARQUES et al., 2009). e inexistentes quando se trata da espécie ovina.

Dessa forma, com este estudo pretende-se detectar pela técnica da PCR, a presença de DNA de agentes infecciosos pertencentes ao gênero *Ureaplasma* spp e à espécie *Mycoplasma agalactiae*, em amostras de sêmen de reprodutores ovinos, contribuindo para o estudo do risco de transmissão desses agentes infecciosos pelo sêmen na espécie ovina.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Detectar a presença de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em sêmen de reprodutores ovinos.

2.2 Específicos

- Detectar pela técnica da PCR, a presença do DNA de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em amostras de sêmen fresco de reprodutores ovinos.
- Detectar pela técnica da PCR, a presença do DNA de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em amostras de sêmen congelado comercializadas por centrais de inseminação artificial.
- Avaliar a associação entre o tipo de sêmen (congelado e fresco) e a detecção de DNA de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Caracterização do agente etiológico

O termo Micoplasma é convencionalmente usado para designar os *Mollicutes*, uma classe de bactérias caracterizadas pela ausência de parede celular e frequentemente designada como os menores procariontes auto-replicantes. Mais de 200 espécies já foram identificadas até o momento, entre as quais várias são patogênicas ao homem, animais e plantas (CHAZEL et al., 2010).

Dos nove gêneros da classe *Mollicutes*, cinco possuem espécies de interesse veterinário, são eles: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma* e *Asteroplasma*. O gênero *Mycoplasma* abrange a maioria dos patógenos animais (QUIN et al., 2005).

Aproximadamente 40 espécies de micoplasmas já foram identificadas em ruminantes domésticos (bovinos, caprinos e ovinos), algumas delas são patogênicas e ocasionam doenças que são pertencentes à lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) por serem enfermidades com impacto econômico. A mais importante é pleuropneumonia contagiosa bovina, cujo agente etiológico é o *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* biotipo Small Colony (*MmmSC*) (EGWU et al., 1996). A segunda é a Pleuropneumonia contagiosa caprina causada pelo *M. capricolum* subesp. *capripneumoniae* (*Mccp*) (THIAUCOURT; BOLSKE, 1996). A terceira é a agalaxia contagiosa, uma doença cosmopolita que afeta os caprinos e ovinos, causando sérios prejuízos à produção leiteira. A agalaxia contagiosa possui muitas formas clínicas (mastite, artrite, pneumonia e septicemia) e é causada por várias espécies de micoplasma, sendo *M. agalactiae* capaz de afetar caprinos e ovinos (MANSO-SILVAN et al., 2009).

Os *Mollicutes* apresentam metabolismo e vias biossintéticas limitadas em função do reduzido genoma (580 a 2200 Kb) da maioria das espécies. Desta maneira, o seu cultivo exige meios enriquecidos, contendo precursores para a biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (ROSEMBUSH, 1994). Os micoplasmas e ureaplasmas formam colônias de aproximadamente 1mm de diâmetro e a ausência de parede celular

desses micro-organismos determina uma morfologia colonial em forma de “ovo frito”. Esses agentes necessitam de atmosfera em concentração de 5-15% de dióxido de carbono para apresentar crescimento satisfatório em meios de cultura artificiais (KIRKBRIDE, 1987).

O crescimento e sobrevivência dos mollicutes são dependentes do pH. Para espécies originárias de plantas e vertebrados, o pH ótimo é de 7,4 e o crescimento ocorre entre pH 6,5 a 8,0. Os ureaplasmas são exceções, pois seu pH ótimo de crescimento ocorre entre 5,5 e 6,0 e seu crescimento é inibido em pH acima de 7,5 (RAZIN et al., 1978).

Os *Mollicutes* exibem estrita relação aos hospedeiros e especificidade a tecidos e órgãos, que reflete as suas características nutricionais e adaptação. Estas bactérias podem ocorrer em hospedeiros e tecidos diferentes de seu *habitat* normal. O *habitat* primário em humanos e animais são as superfícies mucosas do trato respiratório e urogenital, olhos, canal alimentar, glândulas mamárias e articulações (RAZIN, 1992).

3.2 Micoplasmoses em ovinos

O primeiro relato de agalaxia contagiosa de caprinos e ovinos no Brasil foi registrado no estado de São Paulo em 1942 (PENHA; D'APICE, 1942). O primeiro relato de micoplasmoses em ovinos foi realizado na Austrália em 1974 (COTEW et al., 1974).

As micoplasmoses são enfermidades infecciosas que acometem os animais domésticos, entre eles, caprinos e ovinos, caracterizados por diferentes formas de manifestações clínicas (CARDOSO, 2006).

De acordo com Nicholas et al. (2008), as micoplasmoses em ovinos são caracterizadas por síndromes que envolvem quadros de agalaxia contagiosa, infecções respiratórias, distúrbios reprodutivos e infecções oculares.

A principal micoplasmoses da espécie ovina é a agalaxia contagiosa, causada exclusivamente por *M. agalactiae*, pneumonia atípica, causada por *M. ovipneumoniae* e ceratoconjuntivite infecciosa causada pelo *M. conjunctivae* (NICHOLAS et al., 2008).

Os distúrbios respiratórios provocados em ovinos atribuídos à infecção por micoplasmas estão comumente associados à espécie *M. ovipneumoniae*. Outras espécies de *Mycoplasma* também são ocasionalmente associadas com distúrbios respiratórios em ovinos, entre eles *M. arginini* e *M. agalactiae* (NICHOLAS et al., 2008).

Algumas espécies de micoplasmas estão comprovadamente envolvidas em casos de vesiculite, balanopostite, epididimite e outras patologias responsáveis por alterações morfológicas e funcionais dos espermatozóides, como diminuição da motilidade, resultando em baixa qualidade do sêmen (PANANGALA et al., 1981; PILAZEC; TRUSZCZYNSKI, 1988; EAGLESOME et al., 1992)

O *Mycoplasma* ovine/caprino sorotipo 11, conhecido como cepa 2D, ainda não reconhecido como espécie, foi relacionado a casos de vulvovaginite e problemas reprodutivos em ovinos e caprinos na Austrália, Estados Unidos, Inglaterra, França e Nigéria (NICHOLAS et al., 1999). Outras espécies com potencial patogênico também foram isoladas do trato reprodutivo, são elas: *M. mycoides subesp capricolum*, *M. bovigentialium*, *M. agalactiae*, *M. mycoides subesp. capri*, *M. capricolum*, *M. arginini*, *M. alkalencens* e *Acholeplasma* spp. (JONES et al., 1983).

Os ureaplasmas podem estar associados às perdas reprodutivas devido a falhas na concepção, na implantação do embrião no útero ou interferência no desenvolvimento fetal. A infecção por ureaplasmas pode resultar em placentite, mas o abortamento não indica necessariamente a ocorrência de surto por esse agente (PUGH, 2005).

A agalaxia contagiosa é uma enfermidade que acomete caprinos e ovinos de ambos os sexos, sendo que as fêmeas apresentam quadro clínico característico. O agente penetra no hospedeiro por via oral, respiratória ou mamária, é carreado por via hematogênica para a glândula mamária, causando um quadro de mastite aguda uni ou bilateral, com progressão para septicemia e, eventualmente, óbito (CARDOSO, 2006). Clinicamente, a doença é caracterizada por elevações de temperatura, inapetência, alteração na consistência do leite produzido, com subsequente declínio e falha na produção de leite, em 2 a 3 dias como resultado de uma mastite intersticial (CORRALES et al., 2007).

O agente é rapidamente disseminado por contato entre animais infectados e saudáveis. A disseminação do micro-organismo no ambiente ocorre por meio de descargas oculares e nasais, leite, fezes, urina e excreções de lesões abertas e do trato

genitourinário dos machos. Animais jovens são comumente infectados ao ingerir o colostro ou leite contaminado (MADANAT, 2001).

No Brasil, há relatos de isolamentos de *Mycoplasma* spp. em ovinos com problemas de mastite, agalaxia, ceratoconjutivite (NASCIMENTO et al., 1986), respiratórios (MULLER et al., 1998) e reprodutivos (BUZINHANI et al., 2007).

Azevedo (2005) descreveu mastite seguida de agalaxia, poliartrite, ceratoconjutivite em sete casos na Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, no período compreendido entre agosto de 2001 e setembro de 2002. Nesse estudo realizado em rebanhos caprinos leiteiros e ovinos, *Mycoplasma agalactiae* foi isolado e identificado como o micro-organismo responsável pela infecção por provas bioquímicas e técnica de PCR.

Gregory et al. (2004) descreveram o primeiro relato de isolamento de micoplasmas obtidos a partir do sêmen em ovinos no Brasil. Gregory et al. (2012) isolaram *Ureaplasma* spp. em 12,12% das amostras de sêmen estudadas.

Gregory et al (2012), em estudo sobre a interferência da infecção por *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. na qualidade do sêmen ovino, estimaram um maior risco de ocorrência de alterações na motilidade dos espermatozoides (OR 1,33) e células polimorfonucleares (OR 2,5), nas amostras de sêmen contaminadas por esses agentes. Sugeriram ainda, a inclusão do monitoramento de infecções por *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. em ovinos nas análises de rotina a serem executadas.

Rizzo et al. (2011) pesquisaram *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp. e *Acholeplasma laidlawii* em amostras de muco vaginal de 60 ovinos criados na região de Piedade, estado de São Paulo pelo cultivo e detecção do respectivo DNA pela técnica da PCR e constataram que todos os isolados obtidos de *Ureaplasma* spp. foram provenientes de animais com distúrbios reprodutivos, sugerindo o possível envolvimento desse agente nas enfermidades da reprodução na espécie ovina.

3.3 Mecanismos de patogenicidade dos micoplasmas

A maioria dos *Mollicutes* vive como comensais, e em muitos artrópodes eles podem ser considerados simbiossomas (HAHN et al., 1998). As infecções por micoplasma

raramente são do tipo agudas ou fulminantes, em sua maioria, seguem um curso crônico. Pode-se dizer que os micoplasmas estão bem próximos do conceito de “parasito ideal”, geralmente convivendo harmonicamente com seu hospedeiro (RAZIN et al., 1998).

Os fatores de virulência dos *Mollicutes* são pouco conhecidos. No entanto, acredita-se existir competição entre as células hospedeiras e os micro-organismos por substratos metabólicos, como os precursores de lipídeos, pirimidinas e purinas pré-formadas. Os *Mollicutes* que infectam humanos e animais são considerados como parasitos de superfície, pois aderem à mucosa do trato respiratório e urogenital. Este processo pode estar relacionado a dificuldade de eliminação desses patógenos por secreções mucosas ou urina (RAZIN et al., 1998)

A aderência dos micro-organismos interfere na espermatogênese, transporte espermático, capacitação e fecundação. Os espermatozóides podem atuar na transmissão dos agentes, pois os antibióticos rotineiramente utilizados em centrais de inseminação artificial não eliminam micoplasmas e ureaplasmas (ERA et al., 1995)

A base molecular da patogenicidade dos micoplasmas ainda requer muitos estudos para ser elucidada. Entretanto, já se sabe que o quadro clínico deflagrado nas infecções por micoplasmas em humanos e animais está mais associado a lesões causadas pelas respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro do que aos efeitos tóxicos diretos causados pelos componentes celulares dos micoplasmas (RAZIN et al., 1998).

Inexiste associação de toxinas potentes com micoplasmas. Os produtos mais tóxicos do metabolismo dos micoplasmas são o peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos, associados a lesões oxidativas em membranas de células dos hospedeiros. A amônia resultante da hidrólise da uréia pela potente urease dos ureaplasmas também pode ser considerada um fator de virulência, provavelmente afetando os tecidos adjacentes às ureaplasmas vivas (LIGON; KENY, 1991). Outro fator de virulência associado às infecções por ureaplasma foi proposto por Kim et al. (1994), quando observaram uma diminuição significativa nos níveis de prostaglandina E₂ e F_{2α} produzidas por células endometriais em vacas infectadas por *Ureaplasma diversum*. Esse pode ser um ponto relevante na compreensão da patogenicidade de ureaplasmas em gestantes (CASSEL et al., 1993). Já detalhes da interação entre micoplasmas e espermatozóides não são bem definidos, embora tenham sido visualizadas por

microscopia eletrônica evidências de interações muito próximas entre espermatozóides e micoplasmas, principalmente na região do acrossoma e ao longo da cauda (BIELANSKI et al., 1999).

A limitação na síntese dos componentes para o metabolismo e a dependência do meio externo, somada à capacidade de interação com a célula hospedeira, sugerem que os micoplasmas necessitam dos componentes do hospedeiro e transformam este mecanismo em fator de patogenicidade (RAZIN, 2002)

Razin et al. (1998), citam ainda como mecanismos de patogenicidade atribuídos aos micoplasmas, os efeitos clastogênicos, associados a íntima interação entre os citoplasmas do hospedeiro e dos micoplasmas e ação da potente nuclease do agente infeccioso.

3.4 Diagnóstico

Os micoplasmas são micro-organismos fastidiosos e exigem meios ricos para seu crescimento. Cuidados adicionais devem ser adotados na colheita e no transporte do material clínico para minimizar contaminações que podem inviabilizar o seu isolamento (CARDOSO et al., 2000). Técnicas moleculares como a PCR têm sido utilizadas para identificação e detecção de micoplasmas e ureaplasmas em amostras clínicas e apresenta uma alta sensibilidade (BUZINHANI et al., 2007).

O cultivo de micoplasmas pode ser prejudicado, mesmo quando se utilizam condições ótimas. O tipo de amostra clínica, o método de colheita e transporte, a exigência nutricional e o número de micoplasmas viáveis no material clínico podem interferir no cultivo (BUZINHANI et al., 2007).

Os ureaplasmas podem perder sua viabilidade antes de serem incubados, porém, quando não ocorre a degradação completa do DNA, podem ser detectados pela PCR (BUZINHANI et al., 2007).

O diagnóstico da micoplasmose pela PCR combina o primer MGSO selecionado a partir da região 16S rRNA com o oligonucleotídeo procariótico GPO-3, que amplifica um fragmento de 715 pares de bases, o qual está presente em todos os organismos da classe *Mollicutes* (KUPPEVELD et al., 1992).

Assim, as técnicas de diagnóstico molecular são usualmente indicadas para o uso rotineiro na detecção de micro-organismos que crescem lentamente, *in vitro*, requerem meio de cultura complexo e tempo de incubação prolongado. No caso dos *Mollicutes*, os parâmetros de dificuldade de crescimento evidenciam a necessidade do uso rotineiro de técnicas moleculares na sua detecção (RAZIN et al., 1987).

3.5 Vigilância epidemiológica e controle

De acordo com Ayiling et al. (2004), tem se demonstrado um aumento no interesse de promover o monitoramento da distribuição da ocorrência de micoplasmoses para gerenciar os riscos de introdução, emergência e re-emergência da doença em países europeus, evitando assim perdas econômicas para estes países.

O Reino Unido era o único país europeu que possuía até então um serviço de vigilância epidemiológica nacional que regularmente publicava resultados de prevalência (AYILING et al., 2004).

Desde 2003, a França vem implementando um sistema nacional de vigilância epidemiológica conhecido como VIGIMYC (Vigilância para as micoplasmoses de ruminantes), cujo objetivo é determinar quais micoplasmas estão usualmente envolvidos como agentes etiológicos de doenças em ruminantes. O programa possui preocupação especial na detecção do *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* biotipo Small Colony (*MmmSC*), agente etiológico da Pleuropneumonia Contagiosa Bovina.

O VIGIMYC encontra como principal dificuldade, especialmente na realização da tipificação dos agentes envolvidos, as mudanças rápidas pelas quais passam a biologia dos micoplasmas. Descobertas recentes, como a plasticidade genômica, capacidade de atravessar barreiras específicas e existência de tipos intermediários de micoplasmas, aliado a epidemiologia e diagnóstico tem modificado o entendimento sobre as micoplasmoses (HAZEL et al., 2010).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) normatizou o Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO) que possui como objetivos principais o controle das lentivirose (CAE e MAEDI-VISNA) e a epididimite ovina, tendo como agente etiológico bactérias do gênero *Brucella*.

(MAPA, 2012). Não sendo, portanto, contemplada a vigilância epidemiológica das micoplasmoses em programa nacional para os pequenos ruminantes.

Sobre o controle das micoplasmoses, Cardoso (2006) indica o uso de medidas profiláticas de higiene na ordenha e em geral, fornecimento de colostro artificial para os animais jovens, para evitar a transmissão via leite, e a eliminação controlada aos animais resistentes ao tratamento e/ou que perderam tetos. E também recomenda estudos direcionados para outras espécies, além do *Mycoplasma agalactiae*, como as pertencentes ao gênero *Ureaplasma* spp., que causam problemas reprodutivos.

Quanto ao controle de micoplasmoses em centrais de inseminação artificial, estudo realizado por mez-Mart (2012), indica a necessidade de adoção de medidas além das previstas pelo manual da OIE, para introdução de animais nesses estabelecimentos, tendo em vista as descobertas quanto aos portadores assintomáticos, que podem carrear micoplasmas em seus canais auditivos. Sendo necessária a implantação de rotina laboratorial para isolamento e PCR de suabes auriculares e também de amostras de sêmen produzidas nessas centrais. A prática já vem sendo adotada em centrais de inseminação artificial de caprinos na Espanha, tendo como objetivo, o controle da agalaxia contagiosa.

4 REFERÊNCIAS

- AFSHAR, A.; EAGLESOME, M. D. Viruses associated with bovine sêmen. **Veterinary bulletin**, Farnham Royal, v. 60, n.2, p. 103-109, 1990.
- AK, K. et al. Experimental studies on the effects of *Mycoplasma agalactiae* on spermatological characters and genitals in rams. **Pendik Veterinary Mıckrobiyol Derg**, Istanbul, v. 26, n. 2, 1995.
- AYILING, R.D.; BASHIRUDDIN, S.E.; NICHOLAS, R.A.J.; *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. **Veterinary Record**, London, v.155, p.413-416, 2004.
- AZEVEDO, E. O. **Aspectos clinico-epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da agalaxia contagiosa dos caprinos (ACOC) no Brasil**. 2005. 87f. Tese (Doutorado)-Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- BAKER, S.; BASHIRUDDIN, J. B.; NICHOLAS, R.A.J Molecular detection of *Mycoplasma conjunctivae* antibodies in English sheep affected by infectious keratoconjunctivitis. **Veterinary Research**, Les Ulis, v.32, p.155-164.2001.
- BANDEIRA, D. A. et al. Infection by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat herds in the microregion state of Cariri in Paraíba State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.5, p.1255-1258, 2008.
- BIELASNSKI, A.; DEVENISH, J.; PHIPPS-TODD, B. Effect of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma bovigenitalium* in semen on fertilization and association with in vitro produced morula and blastocyst stage embryos. **Theriogenology**, Stoneham, n.53, p. 1213-1223, 1999.
- BUZINHANI, M.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma spp* e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, p.1368-1375, 2007.
- CARDOSO, M.V. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers: first report. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.66, p.137-143, 2000.

CARDOSO, M.V. et al. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen de touros de monta natural e central de inseminação artificial. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.33-40. 2006.

CASSEL, G.H. et al. Ureaplasma urealyticum: role in prematurity and disease in newborns. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v.6, p.69-87, 1993.

CHAZEL, M. et al. Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. **BMC Veterinary Research**, London, v. 6, n.32, 2010.

CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ, A. The role of intramammary pathogens in dairy goats. **Livest Producer Science**, v.79, p.273-283, 2003.

CORRALES, J.C. et al. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant research**, Amsterdam, n.68, p.154-166. 2007.

COTEW, G. S. et al. Isolation of a mycoplasma from vulvovaginitis in sheep. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v.50, n.12, p.576-577, 1974.

EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M. M.; STEWART, R. B. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part. II *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma* spp., *Chlamydia*; pathogens and semen contaminants; threatment of bull semen with antimicrobial agents. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal v.62, p.887-910, 1992.

EGWU, G.O.; NICHOLAS, R.A.J.; BASHIRUDDIN, J.B. Contagious Bovine Pleuropneumonia: an update. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal. v.66, p.875-888, 1996.

ELLIS, F. **Peasant economics: Farm households and agrarian development**. 2.ed. New York Cambridge University Press, (Wye Studienin Agricultural and Rural Development), 309 p. 1996.

EMPARN. **Manejo sanitário de caprinos e ovinos**. Natal, RN: EMPARN, 2006. 32 p. (Circuito de tecnologias adaptadas para a agricultura familiar; v.3).

- ERA, D. O.; CHENOWETH, P. J.; BROWN, M. B. Ureaplasma infection on the bovine. **Archives of STD/HIV research**, Tokyo, v.7, p.239-243. 1995
- GIACOMETTI, M. et al. Detection and identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivitis by PCR based on the 16S rRNA gene. **Journal Veterinary Medicine**, Berlin, v.46, p.173-180, 1999.
- GREGORY, L. Surto de ceratoconjuntivite infecciosa dos caprinos causada por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos criados no estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v.70, n.2, p.179-181, 2003.
- GREGORY, L. et al. Primeiro isolamento de *Ureaplasma* spp. em sêmen e swab vaginal de ovinos no estado de São Paulo. In: **Congress on animal reproduction**, 15. 2004. Porto Seguro. Anais..., v.1, p. 280.
- GREGORY, L. et al. Interference of Mycoplasma spp. or Ureaplasma spp. in Ovine semen quality. **Journal of Microbiology Research**, Rosemead, v.2, n.5, p.118-122, 2012.
- HAHN, T. W.; WILLBY, M. J.; KRAUSE, D. C. HMW1 is required for cythadesin P1 trafficking to the attachment organelle in *Mycoplasma pneumonia*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.1270-1276, 1998.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho. Disponível em [HTTP://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=20&i=p&c=73](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=20&i=p&c=73). Acesso em 25 mar. 2012. Dados 2010.
- JONES, G. E. et al. Isolation of exotic Mycoplasma from sheep in England. **Veterinary Record**, London, v.3, p.540, 1983.
- KAPOOR, S. G.; SINGH, P. P.; PATHAK, R. C. Prevalence of mycoplasma/acholeplasma in the genital tract of sheep. **The Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v.54, n.7, p.553-556, 1984.
- KIM, J. J.; QUIN, P. A.; FORTIER, M. A. Ureaplasma diversum infection in vitro alters Prostaglandin E2 and Prostaglandin F2 α production by bovine endometrial cells without affecting cell viability. **Infectious and Immunity**, Washington, v.62, p.1528-1533, 1994.

KIRKBRIDE, C.A. Mycoplasma, Ureaplasma and Acholeplasma infections of bovine genitália. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.3, p. 575-591, 1987.

KOTANI, H.; NAGAMOTO, H.; OGATA, M. Isolation and serological comparison of ureaplasmas from goats and sheep. **Japanese Journal Veterinary**, Sapporo, v.42, p.31-40. 1980.

KUPPEVELD et al., 1992).

LAUERMAN, L. H. Mycoplasma PCR assays. In: **Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Alabama, EUA. Dept. of Agriculture and Industries, 1998.

LIGON, J. V.; KENY, G. E. Virulence of Ureaplasma urease for mice. **Infectious and Immunity**, Washington, v.59, p.1170-1171.1991

MADANAT, A.; ZENDUKOVA, D.; POSPISIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. **Acta Veterinary BRNO**, Brno, n.70, p.403-412, 2001.

MAPA-Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em 16 jun 2012.

MANSO-SILVAN, L. et al. *Mycoplasma leachi* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v.59, p.1353-1358, 2009.

MARQUES, L. M. et al. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine straws for artificial insemination. **Veterinary Record**, Amsterdam, v.165, p.572-573. 2009.

MELO, A. N. et al. Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.36, n.2, p. 105-112, 2012.

Mez-MART, A. G. et al. Controlling contagious agalactia in artificial insemination centers for goats and detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *Capri* in semen. **Theriogenology**, Stoneham, v.77, p.1252- 1256. 2012.

MULLER, E. E.; NASCIMENTO E. R.; METTIFOGO, E.; Isolamento de *Mycoplasma arginini* e *Actinomyces piogenes* de ovino com pleuropneumonia. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.118-119, 1998.

NASCIMENTO, E. R. et al. Isolation of *Mycoplasma mycoides*, from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. **Brazilian Veterinary Journal**, São Paulo, v.142, p.246-249. 1986.

NICHOLAS, R. A. J.; AYILING, R. D.; LORIA, G. R. Ovine mycoplasmal infections. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.76, p.92-98, 2008.

NICHOLAS, R. A. J. et al. Isolation of *Mycoplasma* ovine/caprine serogroup 11 from infertile sheep in Britain. **Veterinary Record**, London, v.9, p.434, 1999.

PANANGALA, V. S. et al. Decreased motility of Bull spermatozoa caused by *Mycoplasma bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.42, p.2090-2093, 1981.

PENHA, A. M.; D'APICE, M. Agalaxia contagiosa das cabras em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 13, p. 299-301, 1942.

PILASZEK, J.; TRUSZCZYNSKI, M.; Affinity of microorganisms of genus *Ureaplasma* to the reproductive organs of cattle. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious diseases**, Oxford, v.11, p.177-180, 1988.

PUGH, D. G. Clínica de ovinos e caprinos. In: Mobini, S. et al. **Teriogenologia de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, cap.6, p.206, 2005.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiological Reviews**, Bethesda, v.42, p.414-470, 1978.

RAZIN, S.; HYMAN, H. C.; WOGUEU, D. DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma* (*Mollicutes*). **Israel Journal of Medical Sciences**, Jerusalem, v.23, p.735-741, 1987.

RAZIN, S. **The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasm* and *Asteroplasm***. In Ballows, H. G. et al., *The Prokaryotes*, v.2, 2.ed., Springer-Verlag, New York, N.Y.1991.

RAZIN, S. Mycoplasma and Taxonomy and Ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas molecular biology and Pathogenesis**. American Society for Microbiology, Washington, p. 3-22. 1992.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Molecular and diagnostics procedures in mycoplasmaology**. v. 1. Molecular characterization . Academic Press, Inc., San Diego, California.1995.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; YEHUDITH, N. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.62, n.4, p.1094-1156, 1998

RAZIN, S. Cythaderence and the cytoskeleton. In: BALISH, M. F.; KRAUSE, D. C. **Mycoplasmas molecular biology and pathogenicity**. Washington: American Society for Microbiology, p.491-518, 2002.

RIZZO, H. et al. 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**, Santa Maria, v.41, n.2, p.324-329, 2011.

ROSEMBUSH, R. F. Biology and Taxonomy of the Mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W.; ROSEMBUSH, R. F.; LAUERMAN, L. (Ed.). **Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis**. Ames, Iowa State University Press, p.03-11. 1994.

THIAUCOURT, F.; BOLSKE, G. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary micoplasmoses of sheep and goats. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, n. 15, p. 1397-1414, 1996.

THIBIER, M.; GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction science**, Amsterdam, v. 62, p. 233-251, 2000.

VAN KUPPEVELD, F. J. M. et al. Genus and specific identification of Mycoplasmas by 16S RNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washintgon, v.58, n.8, p.2006-2015, 1992.

WANDER, A.E. et al. **A caprino-ovinocultura como alternativa de geração de emprego e renda no Nordeste do Brasil**. (palestra não-publicada). 2003.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Detecção de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em sêmen de reprodutores ovinos.¹

ABSTRACT. - [Deteccion of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma agalactiae* by the polymerase chain reaction (PCR) in...] Detecção de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em sêmen de reprodutores ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), Av. Bom Pastor s/n, Cx. Postal 152, Mundaú, Garanhuns, PE 55296-901, Brasil, Email: chicoesam@yahoo.com.br

The objective of this study was to detect the presence of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma agalactiae* in sheep semen by the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). We analyzed 240 samples, 120 frozen semen obtained from plants artificial insemination (AI) and 120 fresh semen of breeding sheep from the states of Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco and Rio Grande do Norte. For fresh semen was detected DNA of *Ureaplasma* spp. 8.3% (10/120) of samples and 6.7% (8/120) of *Mycoplasma agalactiae*. Samples of frozen semen was detected *Ureaplasma* spp. in 2.5% (3/120) and *Mycoplasma agalactiae* of 4.2% (5/120). To evaluate the association between the type of semen and DNA detection for *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma agalactiae*, a significant association was observed only for *Ureaplasma* spp. ($p = 0.046$). Results obtained in this study, there is the presence of DNA of these microorganisms in semen breeding sheep. Thus, it is suggested that techniques for detecting these agents are used in insemination centers and breeding sheep with high genetic potential to maximize the efficiency of the circulation in sheep reproduction by preventing the spread of pathogens.

INDEX TERMS: Mollicutes, small ruminants, PCR.

RESUMO - Objetivou-se com este estudo detectar a presença de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em sêmen de ovinos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram analisadas 240 amostras, sendo 120 de sêmen congelado obtidas de centrais de inseminação artificial (IA) e 120 de sêmen fresco de reprodutores ovinos provenientes dos estados de Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Para o sêmen fresco, detectou-se DNA de *Ureaplasma* spp. em 8,3% (10/120) das amostras analisadas e 6,7% (8/120) de *Mycoplasma agalactiae*. Nas amostras de sêmen congelado, detectou-se *Ureaplasma* spp. em 2,5% (3/120) e

¹ Pesquisa Veterinária Brasileira

Mycoplasma agalactiae em 4,2% (5/120). Ao avaliar a associação entre o tipo de sêmen e a detecção de DNA para *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma agalactiae*, observou-se associação significativa somente para *Ureaplasma spp.* ($p= 0,046$). Diante dos resultados obtidos neste estudo, constata-se a presença de DNA destes micro-organismos em sêmen de reprodutores ovinos. Desta forma, sugere-se que técnicas para detecção desses agentes sejam utilizadas em centrais de inseminação e em reprodutores ovinos com alto potencial genético, maximizando a eficácia da prática na reprodução de ovinos, evitando a disseminação de patógenos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Mollicutes*, pequenos ruminantes, PCR.

INTRODUÇÃO

A associação entre *Mollicutes* e distúrbios reprodutivos em pequenos ruminantes foi relatada por Kotani et al (1980) e Nicholas et al (1999). Sendo relacionados com casos de vulvovaginites e outras desordens reprodutivas em animais na Austrália, França e Nigéria (Nicholas et al., 1999). Gregory et al (2012), concluíram que há uma interferência na qualidade do sêmen fresco de ovino infectado por *Mycoplasma spp.* ou *Ureaplasma spp.*, visto que ocorrem alterações na motilidade dos espermatozóides e presença de células polimorfonucleares.

As bactérias do gênero *Mycoplasma* devem ser investigadas uma vez que acarretam prejuízos econômicos e também por se tratarem de agentes passíveis de serem transmitidas pela inseminação artificial (Thibier & Guerin, 2000). Nesse contexto, merecem destaque infecções por *Mycoplasma* subsp. *mycoides*, *M. bovinogenitalium*, *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. arginini*, *M. alkalescens* e *Acholeplasma spp.* (Kapoor et al., 1984; Ak et al., 1995; Nicholas et al., 1999). *Mycoplasma agalactiae* foi observado em condições experimentais como causa de lesões no trato reprodutivo de machos da espécie ovina (Hasso et al., 1993).

No Brasil, existem poucos estudos que avaliam o envolvimento dos *Mollicutes* às alterações reprodutivas nas espécies ovina e caprina, esse tema ainda deve ser mais explorado (Rizzo et al., 2011). Gregory et al. (2012) isolaram *Mycoplasma spp.* e *Ureaplasma spp.* de amostras de sêmen fresco de ovinos da região de Piedade, SP. Dados sobre detecção de ureaplasma em sêmen congelado são escassos, especialmente no Brasil (Marques et al., 2009), e inexistentes quando se trata da espécie ovina.

Devido à escassez de dados na literatura sobre essa temática e com o intuito de contribuir para o estudo do risco de transmissão desses agentes pelo sêmen, objetivou-se com esse trabalho detectar pela técnica da PCR, a presença de DNA de *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma agalactiae* em amostras de sêmen fresco e congelado de reprodutores ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sêmen

Foram utilizadas 240 amostras de sêmen, sendo 120 fresco e 120 congelado. As amostras de sêmen congelado foram obtidas em duas centrais de inseminação artificial. As amostras de sêmen fresco foram obtidas de reprodutores, oriundos dos estados de Alagoas (n=6), Ceará (n=1), Paraíba (n=7), Pernambuco (n=100) e Rio Grande do Norte (n=6), como pré-requisito para participação desses animais na exposição nordestina de animais, Recife, Pernambuco.

As amostras de sêmen congelado foram acondicionadas em botijões de nitrogênio líquido e as amostras de sêmen fresco foram colhidas pelo método da eletroejaculação e acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas ao laboratório para seu devido processamento.

Extração de DNA

As amostras de sêmen foram submetidas à extração de DNA com o kit comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit”(Qiagen®), utilizando-se o protocolo do fabricante. Posteriormente, foram submetidas às técnicas para detecção de DNA genômico dos agentes estudados.

Detecção do DNA genômico de *Ureaplasma spp.*

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 18,25µl, contendo 6µl de DNA molde; 0,5 µl de cada primer (UGPF e UGPS) a 30 pmol; 5 µl de água Mili-Q ultrapura e 6,25 µl de Mastermix, de acordo com o protocolo do fornecedor. O perfil térmico da reação foi realizado segundo protocolo descrito por Lauerrman (1998) em termociclador (PTC-100, MJ Research). O DNA foi amplificado em 644 pb e detectado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com bluegreen, visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Detecção do DNA genômico de *Mycoplasma Agalactiae*

Após as extrações dos DNAs, as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo: 2,5µL de tampão ([10mM] de Tris-HCl, pH 8,3), 50pmol de cada “primer”, 1,5mM de MgCL₂, 25mM de DNTPmix, 2,5 unidades (U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 5µL de DNA (0,9µg/mL) e 11µL de água ultrapura para PCR. O perfil térmico das etapas de reações foi feito em termociclador (PTC-100, MJ-Research) de acordo com o protocolo descrito na literatura para *Mycoplasma agalactiae* (Gonzales et al., 1995) com os oligonucleotídeos MarFor: 5'-CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG -3' e MarRev: 5'- CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C - 3'. O DNA foi amplificado em 360pb e detectado por eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corados com bluegreen, visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados.

Análise estatística

Foi empregada a análise estatística descritiva por meio do cálculo das frequências relativa e absoluta e o teste de qui-quadrado para avaliar associação entre sêmen congelado e fresco. Para análise estatística utilizou-se o programa computacional Epi Info 3.5.2 (CDC).

Comitê de Ética

O projeto foi licenciado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UFRPE, licença n. 003/2013.

RESULTADOS

Os resultados da detecção de DNA de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em sêmen fresco e congelado de ovinos encontram-se dispostos na tabela 1.

Das amostras positivas para sêmen fresco para *Ureaplasma* spp. observou-se que 80% (8/10) foram procedentes do estado de Pernambuco, 10% (1/10) da Paraíba e 10% (1/10) do Rio Grande do Norte. Para *Mycoplasma agalactiae*, foram verificadas entre as amostras positivas a seguinte distribuição: 75% (6/8) procedentes do estado de Pernambuco, 12,5% (1/8) do estado da Paraíba e 12,5% (1/8) do Rio Grande do Norte. Não foram verificadas amostras positivas para nenhum dos agentes estudados nas amostras oriundas dos estados de Alagoas e do Ceará.

Ao avaliar a associação entre o tipo de sêmen e a detecção de DNA para *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae*, observou-se associação significativa para *Ureaplasma* spp. ($p= 0,046$), sendo mais comum a detecção de DNA desse agente em amostras de sêmen fresco. Para pesquisa de *Mycoplasma agalactiae* não foi verificada associação significativa ($p=0,393$).

Das oito amostras de sêmen fresco positivas para *Mycoplasma agalactiae*, 37,5% (3/8) também foram positivas para *Ureaplasma* spp. Tal fato não foi observado nas amostras de sêmen congelado, nas quais todas as amostras foram positivas apenas para um dos agentes.

DISCUSSÃO

Foi detectada pela primeira vez no Brasil a presença de DNA de *Ureaplasma* spp. em amostras de sêmen congelado procedentes de ovino. Destaca-se que o sêmen procedente das duas centrais de inseminação foram positivos para detecção deste agente. Em relação ao sêmen fresco observou-se uma frequência de 8,3% e considerando a procedência dos animais constatou-se que 60% (3/5) dos estados possuíam amostras positivas. Gregory et al. (2012) detectaram a presença de *Ureaplasma* spp em 12,2% (4/33) das amostras de sêmen fresco de ovinos pela técnica de isolamento.

Em relação à pesquisa de *Mycoplasma agalactiae*, observou-se a detecção de DNA em 6,7% (8/120) das amostras de sêmen fresco e 4,2% (5/120) de sêmen congelado. Este agente já foi detectado no Brasil na espécie ovina e caprina em estudos anteriores, mas com espécimes

biológicas diferentes (Azevedo, 2005). Sendo este estudo o primeiro a registrar a detecção no sêmen da espécie ovina.

Estudo conduzido por De La Fe et al. (2009) com amostras de sêmen de caprinos na Espanha detectou uma frequência de 2,6% de DNA de *M. agalactiae*. De acordo com estes autores, a detecção deste agente em amostras de sêmen fresco de caprinos assintomáticos indica a possibilidade de disseminação desse agente pela monta natural e inseminação artificial nesta espécie. Tal fato, também deve ser considerado para os resultados apresentados neste estudo com reprodutores ovinos, tendo em vista que os animais utilizados não possuíam histórico de micoplasmose e ao exame andrológico não foi verificada alterações nos parâmetros reprodutivos.

Ao analisar a procedência do sêmen fresco observou-se que 60% (3/5) dos estados possuíam animais com amostras positivas e que 100,0% das centrais possuíam sêmen positivo para *M. agalactiae*. Bandeira et al. (2008) isolaram *M. agalactiae* de casos de agalaxia, poliartrite e ceratoconjuntivite em animais caprinos procedentes dos estados da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte e concluíram que existia uma relação entre a positividade e participação destes animais em exposições e torneios leiteiros.

Ao analisar a diferença entre a presença de *Ureaplasma* spp. em sêmen congelado e fresco verificou-se associação significativa, sendo mais comum a detecção deste agente em amostras de sêmen fresco. Entretanto, também foi verificada a presença do agente em 2,5% (3/120) das amostras de sêmen congelado. Para a detecção de DNA de *M. agalactiae* e o tipo de sêmen não foi observada associação. Quanto ao sêmen congelado, a frequência detectada de amostras positivas foi maior que a descrita por Amores et al. (2011), que observaram uma frequência de 0,8% de amostras positivas para *M. agalactiae* em 119 amostras de sêmen provenientes de centrais de inseminação artificial de caprinos na Espanha. Entretanto, os autores afirmam que os animais com resultado positivo, obtiveram resultados negativos numa coleta prévia, antes do ingresso nas centrais de inseminação, e sugerem que há uma subestimação dos resultados no estudo, necessitando maior aprofundamento em pesquisas sobre a dinâmica da infecção e eliminação de micoplasmas em machos da espécie caprina.

Murray (2012) cita que a adição de antibióticos, antes do congelamento do sêmen, pode reduzir a quantidade de micro-organismos. Entretanto, essa adição não é eficiente para eliminar a presença de *Ureaplasmas*. Ainda, Cardoso & Vasconcelos (2004) relataram que os antibióticos comumente utilizados nas diluições de sêmen antes do congelamento são ineficazes contra a classe *Mollicutes*.

A detecção de DNA de *Ureaplasma* spp. e *M. agalactiae* associados foi observada em 37,5% (3/8) das amostras positivas de sêmen fresco, indicando uma infecção mista. Estes agentes estão associados com a ocorrência de distúrbios como vesiculite, epididimite e alterações na morfologia espermática, incluindo redução na motilidade. Gregory et al. (2012) observaram diminuição da motilidade e aumento da quantidade de células polimorfonucleares quando do isolamento associado de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. em sêmen de reprodutores ovinos, os riscos estimados foram de 1,33 e 2,5 respectivamente.

Os resultados do presente estudo se tornam preocupantes visto que estes agentes podem ocasionar problemas reprodutivos na espécie ovina e que exames para detecção do mesmo não são realizados na rotina das centrais de inseminação, o que pode favorecer a disseminação do agente para outros animais de diferentes regiões do país e consequentemente, ocasionar prejuízos para cadeia produtiva da ovinocultura.

Dessa forma, práticas de controle e profilaxia das micoplasmoses devem ser implementadas no manejo de reprodutores da espécie ovina, principalmente, entre os que possuem alto potencial genético, como os que participam de exposições de suas raças. Ainda, devem ser inseridas na rotina de exames destes animais e também por parte das centrais de inseminação artificial, técnicas de diagnósticos para a detecção dos agentes envolvidos neste estudo com o intuito de evitar a disseminação dos mesmos, maximizando a eficiência do manejo reprodutivo na espécie ovina.

Agradecimentos – A CAPES pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho com auxílio financeiro PNPd processo n. 23038.008556/2010-01.

REFERÊNCIAS

- Ak, K., Ak, S., Gurel, A., Hasoksuz, M., Baran, A., Ozturkler, Y., Ileri, I.K. & Minbay, A. 1995. Experimental studies on the effects of *Mycoplasma agalactiae* on spermatological characters and genitals in rams. *Pendik Vet. Mikrobiyol. Derg.*, 26(2).
- Amores, J., mez-Mart, A. G., Corrales, J. C., Sanchez, A., Contreras, A. & De La Fe, C. 2011. Presence of contagious agalactia causing mycoplasmas in spanish goat artificial insemination centres. *Theriogenology*, 75: 1265-1270.
- Azevedo, E. O. Aspectos clinico-epidemiológicos e diagnóstico laboratorial da agalaxia contagiosa dos caprinos (ACOC) no Brasil. 2005. 87f. Tese (Doutorado)- Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Bandeira, D.A, Castro, R. S., Azevedo, E. O., Nascimento, E. R., Melo, L. S. S. & Melo, C. B. 2008. Infection by *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat herds in the microrregion of Cariri in Paraíba state, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60 (5): 1255-1258. 2008.
- Cardoso, M. V. & Vasconcellos, S.A. 2004. Importância das micoplasmoses na fertilidade de touros. *Arqs. Inst. Biológico*, 71: 257-265.
- De la Fe, C., Amores, J., Gómez Martín, A., Sánchez, A. & Contreras, J. C. 2009. *Mycoplasma agalactiae* detected in the semen of goat bucks. *Theriogenology*, 72: 1278-1281.
- EPI Info™ for Windows, version 3.5.2 [software na internet]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention - Division of Public Health Surveillance and Informatics; 2013; acesso em 20 mai 2013]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/ei6.htm>
- González, Y. R. C., Bascuñana, C. R. & Bolske, G. 1995. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet. Microbiol.*, 47: 183-190.
- Gregory, L., Rizzo, H., Gaeta, N. C., Tortorelli, G., Cardoso, M. V., Mettifogo, E., Buzinhan, M. & TIMENETSKY, J. 2012. Interference of *Mycoplasma* spp. or *Ureaplasma* spp. in Ovine semen quality. *Journal of Microbiol. Research*, 2 (5): 118-122.
- Hasso, S. A., Al-Aubadi, J. M., Al-Darraji & A. M. 1993. Contagious agalactia in goats: its severity as related to the route of infection and pregnancy. *Small Rum. Research*, 10: 263-275.
- Kapoor, S. G., Singh, P. P. & Pathak, R. C. 1984. Prevalence of mycoplasma/acholeplasma in the genital tract of sheep. *Indian J. Anim. Sci.* 54 (7): 553-556.
- Kotani, H., Nagamoto, H. & Ogata, M. 1980. Isolation and serological comparison of ureaplasmas from goats and sheep. *Jpn. J. Vet. Res.*, 42: 31-40.

- Lauerman, L. H. 1998. Mycoplasma PCR assays. In: Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. Alabama, EUA. Dept. of Agriculture and Industries,
- Marques, L. M., Buzinhani, M., Oliveira Neto, R. C., Yamaguti, M., Guimarães, A. M. & TimenetskyI, J. 2009. Detection of *Ureaplasma diversum* in bovine straws for artificial insemination. Vet. Rec., 165: 572-573.
- Murray, R. D. 2012. Cattle reproduction: Laboratory diagnosis of *Mycoplasma/Ureaplasma* abortion in cattle. Vet. Rec. :130-131.
- Nicholas, R. A. J., Wessels, M., Orme, P. K., Wood, E. & Sachse, K. 1999. Isolation of *Mycoplasma* ovine/caprino serogroup 11 from infertile sheep in Britain. Vet. Rec.,9 : 434.
- Rizzo, H., Meira Junior, E. B. S.,Oliveira, R. C., Yamaguti, M., Buzinhani, M., Timenetsky, J. & GREGORY, L. 2011. 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. Cienc. Rural,41 (2): 324-329.
- Thibier, M. & Guerin, B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. Animal Reproduction science, 62: 233-251.

Quadro 1 - Detecção de DNA de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae* em amostras de sêmen ovino procedentes de centrais de inseminação artificial e exposição de animais.

Material biológico	Micro-organismo							
	<i>Ureaplasma</i> spp.				<i>Mycoplasma agalactiae</i>			
	Positivo		Negativo		Positivo		Negativo	
	F.A.	F.R. (%)	F.A.	F.R. (%)	F.A.	F.R. (%)	F.A.	F.R. (%)
Sêmen fresco	10	8,3	110	91,7	8	6,7	112	93,3
Sêmen congelado	3	2,5	117	97,5	5	4,2	115	95,8

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram verificadas amostras positivas para *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma agalactiae*, tanto em amostras de sêmen fresco, quanto em amostras de sêmen congelado. Assim, estes resultados se tornam preocupantes visto que estes agentes podem ocasionar problemas reprodutivos na espécie ovina e exames para detecção dos mesmos não são realizados na rotina das centrais de inseminação, o que pode favorecer a disseminação do agente para outros animais de diferentes regiões do país e conseqüentemente, ocasionar prejuízos para cadeia produtiva da ovinocultura. Dessa forma, práticas de controle e profilaxia das micoplasmoses devem ser implementadas no manejo de reprodutores da espécie ovina, principalmente, entre os que possuem alto potencial genético, como os que participam de exposições de suas raças. Ainda, devem ser inseridas na rotina de exames destes animais e também por parte das centrais de inseminação artificial, técnicas de diagnósticos para a detecção dos agentes envolvidos neste estudo com o intuito de evitar a disseminação dos mesmos, maximizando a eficiência do manejo reprodutivo na espécie ovina.

7. ANEXO

Instrução aos autores da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira (PVB)

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras "pesadas"), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto PV.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriqueiramente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

LICENÇA N.º.

0031/2013

3244/2011 - A09



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



SOLICITAÇÃO DE LICENÇA PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

1. IDENTIFICAÇÃO DO SOLICITANTE

NOME	José Wilton Pinheiro Junior
INSTITUIÇÃO DE ORIGEM	Universidade Federal Rural de Pernambuco
CARGO/FUNÇÃO	Prof. Adjunto I de Doenças Infecciosas (Bacterioses e Viroses dos Animais Domésticos)
DEPARTAMENTO/UNIDADE ACADÊMICA	Unidade Acadêmica de Garanhuns
ENDEREÇO ELETRÔNICO E TELEFONE	jrilton@uag.ufrpe.br


2. DADOS DA EQUIPE

NOME	FORMAÇÃO/QUALIFICAÇÃO	FUNÇÃO
José Wilton Pinheiro Junior	Médico Veterinário Doutor em Ciência Veterinária Professor Adjunto I	- Coordenação do projeto de pesquisa - Coleta das amostras - Análise laboratorial - Elaboração de relatórios - Tabulação e Análise dos dados obtidos - Publicação do trabalho em periódico especializado
Érica Paes Barreto Xavier de Moraes Oliveira	Médica Veterinária, Doutora/ – bolsista PNPd/Capes	-Colaboradora -Coleta das amostras -Processamento das técnicas moleculares
Rinaldo Aparecido Mota	Médico Veterinário, PhD Professor Associado III /UFRPE	- Colaborador -Coleta das amostras - Processamento das amostras
Leonildo Bento Galiza da Silva	Médico Veterinário, Doutor/ Professor Associado /UFRPE	-Colaborador
Mateus Matiuzzi da Costa	Médico Veterinário, Doutor/ Professor UNIVASF	-Colaborador
Nair Silva Cavalcanti de Lira	Médica Veterinária, Doutora /UFRPE	

3. DADOS GERAIS DO PROJETO

TÍTULO	DETECÇÃO E ESTUDO DA VIABILIDADE DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS NO SÊMEN DE REPRODUTORES OVINOS
ÁREA TEMÁTICA¹	Medicina Veterinária Preventiva
FINANCIAMENTO	MEC/CAPES e CT/CNPq/FINEP Programa Nacional de Pós-Doutorado - PNPD/2010
DATA INICIO/TÉRMINO	Janeiro – 2011/ dezembro-2015
LOCAL DE EXECUÇÃO	CENLAG/UAG-UFRPE Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas/DMV - UFRPE

De acordo com o CNPq

 CEVA - UFRPE
Aprovado em
22/02/2013
Validade