

MARISTELA VASCONCELLOS CARDOSO

***Mycoplasma bovis, M. bovigenitalium e Ureaplasma  
diversum* em touros. Diagnóstico, impacto na reprodução  
e ensaio terapêutico**

São Paulo

2003

MARISTELA VASCONCELLOS CARDOSO

***Mycoplasma bovis, M. bovigenitalium e Ureaplasma diversum* em touros. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Titular Sílvio Arruda Vasconcellos

São Paulo

2003

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1279 Cardoso, Maristela Vasconcellos  
FMVZ *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* em touros. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico / Maristela Vasconcellos Cardoso. – São Paulo : M. V. Cardoso, 2003.  
89 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.  
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Arruda Vasconcellos.

1. Micoplasmose animal. 2. Sêmen animal.  
3. Bovinos. 4. Diagnóstico. I. Título.

## ERRATA

<b>Página</b>	<b>Parágrafo</b>	<b>Linha</b>	<b>Onde se lê</b>	<b>Leia-se</b>
Resumo	1	2	80 amostras	79 amostras
Abstract	1	5	80 samples	79 samples
Lista de figuras	3	1	imunoflorescência	imunofluorescência
16	2	4	Eaglasome	Eaglesome
25	2	6	Eaglasome	Eaglesome
45	4	10	concentração $7 \times 10^9$	concentração $7 \times 10^9$ /ejaculado
61		11	... com oxitetraciclina	... com oxitetraciclina que apresentaram parâmetro seminal inferior ao normal
61		12	... com tiamulin	... com tiamulin que apresentaram parâmetro seminal inferior ao normal
63		11	... com oxitetraciclina	... com oxitetraciclina que apresentaram parâmetro seminal inferior ao normal
63		12	... com tiamulin	... com tiamulin que apresentaram parâmetro seminal inferior ao normal
69	3	2	... uma freqüência de 11%...	... uma freqüência de 10%...
70	1	1	.. foi encontrada em 54,3% (57/105)...	.. foi encontrada em 56,4 (57/101)...
70	1	2	... no Grupo 1 e 17,1% (15/68)...	... no Grupo 1 e 22,1% (15/68)...
70	1	3	... foi de 39,5% (32/81)...	... foi de 43,2% (32/74)...
70	1	3	... foi de 39,5% (32/81) no Grupo 1 e 3,2% (2/63) no Grupo 2...	... foi de 43,2% (32/74) no Grupo 1 e 4,0% (2/50) no Grupo 2...

## ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
71		1	... África do Sul menos....	... África do Sul encontraram menos....
71	1	7	...efetuados em sêmen...	...efetuados em muco...
71	1	8	... para <i>M. bovigenitalium</i> ; PCR para <i>M. bovigenitalium</i> comparada ao isolamento para <i>Mycoplasma</i> spp, além de PCR e isolamento para <i>U. diversum</i> .	... para <i>M. bovigenitalium</i> e isolamento para <i>U. diversum</i> .
73	1	11	...uma exceção foi observada contaminação seminal...	...uma exceção foi observada na contaminação seminal...
80	3	5	... de <i>Mycoplasma</i> spp, e defeitos maiores...	... de <i>Mycoplasma</i> spp, além de motilidade e defeitos maiores...

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

---

Nome: CARDOSO, Maristela Vasconcellos

Título: *Mycoplasma bovis*, *M. bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* em touros.  
Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico."

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutor, junto à Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia da Universidade de  
São Paulo

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Para o meu menino Myatã*

---

## AGRADECIMENTOS

---

Ao professor Sílvio, orientador desta tese, pela incondicional paciência com que encarou todos os percalços deste período.

À todas as meninas do Laboratório de Doenças Bacterianas da Reprodução: Eliana, Margareth, Lília, Rosa, Vanessas (ssona e ssinha), Fabíola, Antera e Mariazinha que, sempre presentes, acrescentaram alegria a este trabalho.

Um agradecimento *super special* à Bióloga Solange Rosa Teixeira (vulgarmente conhecida como Barbie, de Barbosa), do mesmo Laboratório, que além de participar das viagens, ajudar nas colheitas e processar as amostras clínicas, esteve à frente nos diagnósticos durante todos os afastamentos: reforma da casa, créditos do Doutorado, curso no Japão e licença Myatã.

Outro agradecimento *super special* à Veterinária Simone Miyashiro (Japa Blondie), que, com sua paciência nipônica, processou as infinitas amostras clínicas pela PCR, com infinitos *primers*, resultando infinitos resultados.

Aos Veterinários da CATI - Regional General Salgado: Acácio R. Assoni Rodrigues, Fernando Calil Ferreira, Maurício Roberto de Souza e Pedro Lança Neto e aos proprietários das propriedades às quais os mesmos dão assistência.

Ao Dr. Fernando Ferreira por sua colaboração na análise estatística dos dados e à Dra. Lílian Gregory, pela execução dos exames andrológicos dos touros estudados.

À FAPESP, pelo suporte financeiro de parte deste trabalho.

Ao maridones Helvécio e à supermãe Helena, pela paciência, amor e dedicação.



## RESUMO

---

CARDOSO, M. V. ***Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* em touros. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico.** [*Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* in field and CI bulls. Diagnostic, reproduction impact and therapeutic test.] 2003. 89 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Foram analisadas, para fins de diagnóstico das micoplasmoses da reprodução, 105 amostras de muco prepucial e 80 amostras de sêmen *in natura*, provenientes de touros de quatro propriedades rurais e 70 amostras de muco prepucial e 63 amostras de sêmen *in natura*, provenientes de touros de uma central de inseminação artificial, localizadas no Estado de São Paulo. As amostras foram submetidas ao isolamento bacteriano e PCR, para demonstração de presença de *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum*. Colheitas foram realizadas no período de 1999 à 2002, antes e após a implantação de dois métodos de antibioticoterapia, utilizando-se para tal, oxitetraciclina di-hidratada ou fumarato de hidrogênio de tiamulin. O Sistema MGSO/GPO-1 de detecção de Mycoplasmales pela PCR foi testado frente ao isolamento bacteriano. A associação entre a idade e forma de manejo reprodutivo, além da qualidade seminal e a presença dos microrganismos foi analisada através da odds ratio. A eficiência dos métodos de tratamento sobre a qualidade seminal dos touros foi analisada estatisticamente pelos testes de Mann Whitney e Wilcoxon. As frequências de detecção de *Mycoplasma* spp pelo isolamento e pela PCR nas amostras de muco prepucial, foram 45,1 e 63,7%, respectivamente. Nas amostras de sêmen, as frequências foram 22,5% (isolamento) e 24,1 (PCR). O Sistema MGSO/GPO-1 mostrou-se pouco eficiente na detecção dos agentes. Análise estatística revelou que animais com menos de quatro anos têm de 1,39 (*M. bovis genitalium*) até 7,54 (*U. diversum*) vezes mais chance de serem portadores dos microrganismos. A odds ratio de 4,01 até 4,68 (muco prepucial) e de 1,71 até 18,29 (sêmen) mostrou a importância da higiene no manejo reprodutivo. Os animais da Central de Inseminação Artificial apresentaram resposta significativa sobre a motilidade espermática no tratamento com oxitetraciclina ( $p=0,033$ ). As estimativas de risco, pós-tratamento, foram menores para os parâmetros motilidade e defeitos menores, associados à *Mycoplasma* spp e, motilidade e defeitos maiores, associados à *U. diversum*.

Palavras-chave: Micoplasmoses Animal. Sêmen Animal. Bovinos. Diagnóstico.

## ABSTRACT

---

CARDOSO, M. V. ***Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* in bulls. Comparison of diagnostics procedures, interference in reproductive performance and therapeutic assay.** [*Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* em touros utilizados a campo e em centrais de inseminação. Diagnóstico, impacto na reprodução e ensaio terapêutico.] 2003. 89 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Prepuccial mucus and fresh semen were collected from bulls under two kinds of reproductive management: a) natural breeding with cows in four farms, b) an Artificial Insemination Center. All of them located in São Paulo State, Brazil. The samples were collected from 1999 to 2002. In the farms it were collected 105 samples of prepuccial mucus and 80 samples of fresh semen and in the Artificial Insemination Center, 70 samples of prepuccial mucus and 63 of fresh semen. The laboratory tests applied for demonstration of *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* and *Ureaplasma diversum* were classical cultivation and polymerase chain reaction (PCR). The therapeutic assay were performed with oxytetracycline, 20 mg./kg. of body weight, IM, or tiamulin hydrogen fumarate, 15 mg./kg. of body weight, IM. *Mycoplasma* spp was demonstrated in 45,1% and 63,7% of prepuccial mucus samples, respectively by cultivation and PCR and in 22,5% and 24,1% of fresh semen samples, respectively by cultivation and PCR. *Ureaplasma diversum* was demonstrated in 66,5% and 72,9% of prepuccial mucus samples, respectively by cultivation and PCR and in 51,7% and 56,6% of fresh semen samples, respectively by cultivation and PCR. The MGSO/GPO-1 PCR System, was able for demonstration of *Mycoplasma* spp DNA in bovine semen and *U. diversum* in prepuccial mucus, with results in agreement with cultivation. Animals younger than four years of age presented a higher infection rate than older: odds ratio 1.39 (*M. bovis genitalium*) and up to 7.54 (*U. diversum*). Odds ratio from 4.01 to 4.68 (prepuccial mucus) and from 1.71 to 18.29 (semen) showed the importance of the hygienic status of the reproduction management. The animals from Insemination Center, showed better motility after the treatment with oxytetracycline ( $p=0,033$ ). After therapeutic assay, the odds ratio was small for the motility and morphologic aspects of the semen associated to *Mycoplasma* spp and *U. diversum* contamination.

Key words: Animal Mycoplasmosis. Animal Semen. Bulls. Diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

---

	Pág.
Figura 1 - Microscopia eletrônica de transmissão com células de <i>Ureaplasma urealyticum</i> aderidas ao colo de um espermatozóide humano (X 36,000). (FRIBERG, 1980)	31
Figura 2 - Desenho esquemático de um espermatozóide apresentando colônias de <i>U. urealyticum</i> no colo e na parte anterior da cauda. (FRIBERG, 1980)	31
Figura 3 - Espermatozoides bovinos sob imunoflorescência apresentando <i>Mycoplasma bovigenitalium</i> aderidos ao acrossomo e colo. (PANANGALA et al., 1981)	32
Figura 4 - Microscopia eletrônica de espermatozóide bovino apresentando estruturas semelhantes à <i>Mycoplasma</i> aderidas ao acrossomo. (PANANGALA et al., 1981)	32
Figura 5 - Cultivo de muco prepucial bovino apresentando crescimento de <i>Mycoplasma</i> spp e <i>Ureaplasma diversum</i> (X 20)	49
Figura 6 - Cultivo de sêmen bovino apresentando crescimento de <i>Ureaplasma diversum</i> (X 20)	50
Figura 7 - Cultivo de sêmen bovino apresentando presença de polimorfonucleares e crescimento de <i>Ureaplasma diversum</i> (X 20)	50

## LISTA DE GRÁFICOS

---

	Pág.
Gráfico 1 - Proporções de <i>Mycoplasma</i> spp e <i>U. diversum</i> detectados em amostras de muco prepucial bovino, segundo o grupo experimental e a técnica. São Paulo, 1999 – 2002	68
Gráfico 2 - Proporções de <i>Mycoplasma</i> spp e <i>U. diversum</i> detectados em amostras de sêmen bovino, segundo o grupo experimental e a técnica. São Paulo, 1999 – 2002	68

## LISTA DE TABELAS

---

	Pág.
Tabela 1 - Seqüências de nucleotídeos ( <i>primers</i> ) para PCR utilizados para amplificação <i>in vitro</i>	47
Tabela 2 - Cultivos para isolamento de <i>Mycoplasma spp</i> e <i>Ureaplasma diversum</i> em bovinos, segundo o grupo experimental, o material clínico e o microrganismo investigado. São Paulo, 1999 – 2002	54
Tabela 3 - Exames de PCR para <i>Mycoplasma spp</i> , <i>M. bovigenitalium</i> e <i>Ureaplasma diversum</i> em bovinos, segundo o tipo de material clínico, o grupo experimental e o tipo de <i>primer</i> . São Paulo, 1999 – 2002	55
Tabela 4 - Comparação entre as freqüências de detecção de <i>Mycoplasma spp</i> e <i>U. diversum</i> por isolamento e PCR, segundo o material clínico e o grupo estudado. São Paulo, 1999-2002	56
Tabela 5 - Análise comparativa entre o isolamento bacteriano e a PCR, utilizadas para detecção de <i>Mycoplasma spp</i> , <i>M. bovigenitalium</i> e <i>Ureaplasma diversum</i> em muco prepucial bovino. São Paulo, 1999 - 2002	57
Tabela 6 - Análise comparativa entre o isolamento bacteriano e a PCR, utilizadas para detecção de <i>Mycoplasma spp</i> , <i>M. bovigenitalium</i> e <i>Ureaplasma diversum</i> em sêmen bovino. São Paulo, 1999 - 2002	58
Tabela 7 - Estimativas de risco observadas (OD - Odds Ratio) de acordo com a positividade para os diferentes microrganismos estudados, em muco prepucial bovino, segundo a técnica de detecção, para os diferentes grupos, determinados pela idade dos animais e o manejo reprodutivo utilizado. São Paulo, 1998 - 2002	59
Tabela 8 - Estimativas de risco observadas (OD - Odds Ratio) de acordo com a positividade para os diferentes microrganismos estudados, em muco prepucial bovino, segundo a técnica de detecção, para os diferentes grupos, determinados pela idade dos animais e o manejo reprodutivo utilizado. São Paulo, 1998 - 2002	60
Tabela 9 - Alteração na qualidade seminal após tratamento dos touros de campo. São Paulo, 1999 – 2002	61

Tabela 10 - Eficiência dos antibióticos oxitetraciclina e tiamulin sobre a qualidade seminal dos touros de campo. São Paulo, 1999 – 2002	62
Tabela 11 - Alteração na qualidade seminal após tratamento dos touros de Central de Inseminação. São Paulo, 1999 – 2002	63
Tabela 12 - Eficiência dos antibióticos oxitetraciclina e tiamulin sobre a qualidade seminal dos touros de Central de Inseminação. São Paulo, 1999 – 2002	64
Tabela 13 - Taxas de positividade para os microrganismos, segundo a técnica de detecção em muco prepucial e sêmen bovinos, processados em dois momentos, pré e pós-tratamento. São Paulo, 1999 - 2002	65
Tabela 14 - Estimativa de risco para a associação entre a presença de <i>Mycoplasma</i> spp e a qualidade do sêmen em touros, antes e após tratamento. São Paulo, 1999 - 2002	66
Tabela 15 - Estimativa de risco para a associação entre a presença de <i>U. diversum</i> e a qualidade do sêmen em touros, antes e após tratamento. São Paulo, 1999 - 2002	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS<sup>1</sup>

---

µg = microgramas

µm = micrometros

bp = pares de bases

DNA = ácido desoxirribonucléico

kb = kilo bases

kg = kilogramas

mg = miligramas

min. = minutos

ml = mililitros

mm = milímetros

mmHg = milímetros de mercúrio

°C = graus Celsius

rRNA = ácido ribonucléico ribossômico

$p$  = probabilidade associada à hipótese de nulidade

VP = valor preditivo

$\chi^2$  = Qui-quadrado

$n$  = número de animais

OD = odds ratio

CI = intervalo de confiança

$\bar{X}$  = média dos valores

PV = peso vivo

IM = intramuscular

---

<sup>1</sup> Disposta pela ordem alfabética

## SUMÁRIO<sup>2</sup>

---

	Pág.
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> ..... 15
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> ..... 20
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> ..... 21
3.1	OCORRÊNCIA..... 21
3.2	ETIOLOGIA..... 23
3.3	PATOGENIA..... 25
3.4	DIAGNÓSTICO..... 33
3.5	TERAPIA..... 35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> ..... 39
4.1	PROPRIEDADES E CENTRAL DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL..... 39
4.2	ANIMAIS..... 39
4.3	MATERIAIS CLÍNICOS..... 40
<b>4.3.1</b>	<b>Colheita</b> ..... 40
4.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL..... 41
<b>4.4.1</b>	<b>Diagnóstico de <i>Mycoplasma</i> spp e <i>U. diversum</i> : Isolamento</b> ..... 41
<b>4.4.2</b>	<b>Diagnóstico de <i>Mycoplasma</i> spp e <i>U. diversum</i> : PCR</b> ..... 42
4.4.2.1	Extração do DNA Genômico..... 42
4.4.2.2	<i>Primers</i> ..... 42
4.4.2.3	PCR..... 43
4.5	TRATAMENTOS..... 43

---

<sup>2</sup> De acordo com NBR-6027



4.6	EXAMES ANDROLÓGICOS.....	45
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	48
<b>5.1.1</b>	<b>Isolamentos e PCR.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Avaliação da eficiência do Sistema MGSO/GPO-1 frente ao isolamento bacteriano.....</b>	<b>51</b>
5.2	ESTIMATIVAS DE RISCO: IDADE E MANEJO.....	51
5.3	EFICIÊNCIA DA ANTIBIOTICOTERAPIA .....	52
5.4	ESTIMATIVA DE RISCO: QUALIDADE SÊMEN.....	53
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
	REFERÊNCIAS.....	81

## 1 INTRODUÇÃO

---

A pecuária de corte é, para o Brasil, uma atividade de grande importância econômica e, ao que tudo indica, deverá se fortalecer nessa posição nos próximos anos, consolidando-se tanto como produtora de alimento nobre para o mercado interno, como elemento importante na captação de divisas para o país, por sua inserção no mercado mundial de carne bovina. No entanto, e apesar disso, os índices zootécnicos e econômicos que caracterizam atualmente essa atividade estão muito distantes daqueles que poderiam garantir sua competitividade e conseqüente permanência como empreendimento economicamente atraente (EUCLIDES FILHO, 2003).

A seleção genética procurando maximizar o potencial biológico, os progressos na nutrição, instalações e manejo viabilizaram produzir mais animais por área, exigindo dessa forma cuidado especial com a sanidade. A prevenção, erradicação de doenças transmissíveis, controle rigoroso sobre os insumos veterinários utilizados na produção animal constituem um elenco de medidas essenciais para garantir níveis seguros e competitivos na produção de alimentos de origem animal (MOREIRA, 2003).

Os clássicos agentes infecciosos, vírus, bactérias, fungos, espiroquetas, protozoários e helmintos ainda estão presentes e são motivos de preocupação na exploração moderna dos animais, principalmente quando se está aumentando, cada vez mais, a densidade animal por área. A densidade da população animal deve ser vista em todo o território nacional e não só na fazenda. Os países com uma população animal altamente concentrada possuem condições favoráveis para a

propagação desses agentes, desencadeando epidemias de grande porte e longa duração. Outro aspecto a considerar é a transformação, em escala mundial, de um grande número de rebanhos pequenos em um número pequeno de propriedades com grandes rebanhos. A existência de propriedades com 10.000 a 100.000 bovinos de corte, de 200 a 2000 vacas de leite, de 20.000 a 100.000 suínos e granjas com milhões de frangos de corte e aves de postura favorecem a manutenção de determinadas doenças transmissíveis, principalmente as respiratórias, digestivas e por contato direto (MOREIRA, 2003).

O rebanho bovino brasileiro, formado em sua maior parte por animais de corte, é o segundo do mundo com cerca de 170 milhões de cabeças. Sua produtividade pode ser considerada baixa, pois o desfrute está em torno de 13%, o índice de natalidade de 55%, a idade média do primeiro parto é de 45 meses, o abate de 4 a 5 anos, o peso médio das carcaças de 222 Kg e a mortalidade até a idade adulta de 15% a 20% (MOREIRA, 2003). Estes baixos índices de produtividade podem estar associados a causas não infecciosas (mineralização, manejo e/ou alimentação) e infecciosas.

Várias são as doenças infecciosas que afetam o desempenho reprodutivo de bovinos: brucelose, leptospirose, campilobacteriose, rinotraqueite infecciosa bovina, diarréia viral bovina e tricomoníase, estão entre as mais freqüentemente associadas a distúrbios reprodutivos (EAGLASOME et al., 1992; KIRKBRIDE, 1987). Ao lado destas doenças, várias outras, menos conhecidas e conseqüentemente, pouco divulgadas, como as micoplasmoses, deveriam ser investigadas, pois resultam em quadro sintomatológico semelhante aquelas citadas acima, além de constar da Lista B da Organização Internacional de Epizootias (OIE) como doenças suscetíveis de serem transmitidas pela Inseminação Artificial (THIBIER; GUERIN, 2000).

O rebanho bovino de corte é responsável por uma grande parcela da economia nacional, interna e externa, assim sendo, as doenças que prejudiquem sua qualidade atingem diretamente a economia do país. O impacto que as doenças infecciosas da reprodução, têm sobre estes animais é pouco conhecido. Neste contexto estão inseridas as micoplasmoses.

A reprodução animal dos dias de hoje é programada para propiciar retorno econômico ao proprietário rural. Várias técnicas têm sido implementadas e implantadas para aumentar a produtividade individual, por animal e paralelamente, o desempenho do conjunto de animais em fase de reprodução. Técnicas como Inseminação Artificial (IA), Transferência de Embriões (TE), Fecundação *In vitro* (FIV) e o desenvolvimento de drogas e metodologias cada vez mais eficientes para sincronização de cio, são exemplos da tecnologia desenvolvida para melhorar a produtividade dos rebanhos. A presença de microrganismos causadores de doenças infecciosas atinge diretamente esta produtividade.

O fator sanidade deveria corroborar para a qualidade reprodutiva de um plantel e para a seleção dos animais. Ao lado do avanço tecnológico desenvolvido nesta área, o estímulo para a melhoria da qualidade sanitária dos animais seria uma medida fundamental a ser tomada pelos produtores. A carência de informações sobre doenças pouco conhecidas e conseqüentemente pouco investigadas, pode ocasionar equívocos no diagnóstico, prejudicando, assim, a produtividade dos rebanhos.

Os fatores mais importantes que desencadeiam perdas econômicas devido à presença de micoplasmas e ureaplasmas em propriedades agropecuárias são: diminuição do número de gestações, ocorrência de perdas fetais ou partos prematuros com conseqüente diminuição do número de serviços por animal, perdas

na qualidade do sêmen e aumento dos custos com veterinários e drogas para tratamento das infecções (HUFFMAN et al., 1985; MILLER et al., 1994).

Uma contaminação bacteriana maciça do sêmen congelado pode afetar a fertilidade. Neste caso, quando microrganismos patogênicos, são veiculados através da inseminação artificial, eles não têm que atravessar a mucosa vaginal ou cervical, que agem como barreiras para bactérias, mas são introduzidos diretamente no útero (FLATSCHER; HOLZMANN, 1981).

A utilização da inseminação artificial (IA) tornou possível o intercâmbio de material genético de melhor qualidade, e através dessa tecnologia, uma melhora da produção de leite e carne, em nível nacional e internacional. As possibilidades da contaminação do sêmen por agentes patogênicos e a sua disseminação através do mesmo, entretanto, se converteram em uma das principais preocupações para criadores e autoridades sanitárias dos países onde se emprega essa tecnologia (AFSHAR; EAGLESOME, 1990). A tudo isso se deve, também, acrescentar o risco do uso do sêmen infectado nos processos de transferência de embriões (BIELANSKI; DUBUC, 1994). Este alarme crescente está relacionado às implicações epizootiológicas da presença de microrganismos no sêmen, implicações essas que não só se centram na infecção exclusiva da fêmea receptora, ou do coletivo da exploração pecuária, como também na possível introdução de doenças exóticas no país importador (SILVA, 2003).

O risco potencial de transmissão de doenças infecciosas e parasitárias gera uma grande preocupação sobre o intercâmbio nacional e internacional de material genético, e em especial, sobre os métodos de detecção dos possíveis microrganismos veiculados através do sêmen ou dos embriões, obrigando quase

todos os países a implantarem rigorosos programas sanitários voltados para o controle das importações (SILVA, 2003).

A origem dos microrganismos no sêmen pode ser extrínseca, como por exemplo, por contaminação fecal do sêmen no momento da coleta ou intrínseca, devido as infecções locais ou sistêmicas com a disseminação dos agentes através dos testículos, glândulas acessórias ou prepúcio. Dessa maneira, o sêmen é um excelente veículo para a difusão de agentes patogênicos e de defeitos genéticos, principalmente pela grande distribuição de sêmen congelado, e pela capacidade que possui um touro para produzir até 1000 doses deste material a partir de uma única ejaculação (SILVA, 2003).

## 2 OBJETIVOS

---

Devido à escassez de informações referentes à ocorrência de *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* e de sua interferência no desempenho reprodutivo de touros utilizados a campo e em centrais de inseminação no Brasil, foi proposto o presente trabalho, cujos objetivos específicos foram:

- A. Determinar a presença dos microrganismos em quatro propriedades rurais e em uma Central de Inseminação (CI) Artificial no Estado de São Paulo, utilizando-se as técnicas de isolamento e PCR para *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum*;
- B. Avaliar a utilização do Sistema MGSO/GPO-1, através da PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), como método de diagnóstico de triagem para micoplasmoses, em muco prepucial e sêmen;
- C. Avaliar comparativamente o valor diagnóstico da técnica de PCR e o isolamento bacteriano para detecção de *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum*;
- D. Avaliar a positividade para *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum*, nos diferentes grupos, determinados segundo a idade dos animais e o tipo de manejo reprodutivo utilizado;
- E. Avaliar a eficiência da utilização de dois antibióticos, oxitetraciclina ou fumarato de hidrogênio de tiamulin, em função da alteração na qualidade seminal através da observação pré e pós-tratamento;
- F. Estimar o efeito da presença de *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* sobre a qualidade seminal dos touros, antes e após a antibioticoterapia.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

---

#### 3.1 OCORRÊNCIA

Em 1955, Albertsen, na Dinamarca, aventou a possibilidade de que microrganismos resistentes a antibióticos seriam responsáveis pela baixa fertilidade persistente em touros. Com o intuito de esclarecer esta hipótese, detectou 89% (76/85) de amostras positivas para microrganismos do gênero *Mycoplasma* em sêmen. A partir deste período, o isolamento de micoplasmas e ureaplasmas em sêmen e amostras coletadas de trato reprodutivo de touros tem sido relatado.

A contaminação de sêmen e muco prepucial por *U. diversum* foi verificada em 1969, na Inglaterra, quando dez culturas de muco prepucial e 84% de 32 amostras de sêmen *in natura* foram positivas para o agente (TAYLOR-ROBINSON et al., 1969). Posteriormente, Onoviran et al., no Canadá em 1975, observou 35% de 132 amostras de mucos prepuciais, 24% de 140 amostras de sêmen *in natura* e 14% de 42 amostras de sêmen processado, positivas para *U. diversum*. Na Tchecoslováquia, em 1978, foram observados 46,5% de positivos em 202 amostras de sêmen de touros de centrais de inseminação (DOIG, 1981a).

Poumarat e Martel, 1987, relataram que a frequência de contaminação de sêmen por micoplasmas e ureaplasmas variou de acordo com as pesquisas em sêmen *in natura* e sêmen industrializado. A variação também pode ser encontrada entre propriedades, centrais de inseminação e de acordo com as estações do ano. Aproximadamente 40 à 80% dos espermatozoides são infectados por *Mollicutes* e as associações entre espécies é freqüente. A taxa de isolamento em touros é muito



variável: 6 à 67%. De 60 à 100% dos micoplasmas isolados são *M. bovis genitalium* enquanto que *M. bovis* representa aproximadamente 3% dos isolados.

A maior taxa de isolamento de *Mycoplasma* (71%) foi conseguida em vacas com baixa fertilidade comparado com 24% de vacas descartadas por outras razões (Gourlay, 1973)

Fish et al. (1985), no Canadá, observaram que 28% dos touros utilizados para inseminação artificial apresentavam o sêmen contaminado por espécies de micoplasma, porém, nenhuma estirpe de *M. bovis* foi isolada. GARCIA et al., 1986, no Canadá, processaram 2950 amostras e nenhum *M. bovis* foi detectado.

Ball et al. (1987) examinaram 332 amostras de sêmen fresco e detectaram 46% de contaminação por *Mycoplasma* spp, destas, 32% também estavam contaminadas por *Ureaplasma diversum*.

Ruhnke (1994), no Canadá, reportou uma variação de 23 a 84% de touros positivos para *U. diversum* em sêmen fresco; contudo, as amostras de muco prepucial e secreção de uretra distal apresentaram uma variação de 29 a 100% de positivos sendo que a presença de ureaplasmas nestes sítios geralmente não está associada a sinais clínicos.

Le Grand et al. (1995), na França, isolaram *U. diversum* em 74% (37/50) das amostras de sêmen analisadas. Os sorogrupos B e C foram predominantes em machos.

O *Mycoplasma bovis* foi identificado pela primeira vez no Brasil em 1978 por Rossini, em bezerros com pneumonia em uma propriedade localizada no Estado de São Paulo. Posteriormente, Liberal et al. (1982) relataram o isolamento de *Mycoplasma* spp em casos de pneumonia bovina no Estado do Rio de Janeiro.

Terazaki et al. (1991), relataram a presença de algumas espécies do gênero *Mycoplasma* em sêmen bovino processado em Centrais de Inseminação e em sêmen colhido em propriedades rurais do Estado de São Paulo.

Nascimento et al. (1998), no Estado do Rio de Janeiro, isolaram *Mycoplasma* spp a partir de sêmen *in natura* de sete touros mestiços Charolês x Nelore, em rebanho que apresentava infertilidade e abortamentos e que era comprovadamente livre de brucelose, campilobacteriose e tricomonose.

O primeiro registro da presença de *Ureaplasma diversum* em bovinos no Brasil foi efetuado por Cardoso et al. (1997), a partir de muco vaginal de fêmeas que apresentavam Vulvovaginite Granular (VVG). Posteriormente, em levantamento realizado em sete propriedades da macro região de Itapetininga, Estado de São Paulo, de 152 amostras colhidas de 59 vacas com sintomatologia clínica de VVG, houve 54 (91,5%) positivas para *U. diversum* (CARDOSO et al., 2000).

### 3.2 ETIOLOGIA

Desde 1898, quando Nocard e Roux isolaram micoplasmas pela primeira vez em meio artificial, estes microrganismos passaram a ser conhecidos como “Pleuropneumonia Like Organisms” (PPLO) ou organismos semelhantes aos causadores da Pleuropneumonia, primeira patologia reconhecidamente por tais agentes.

Os micoplasmas e ureaplasmas pertencem à classe *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae*, gêneros *Mycoplasma*, com 85 espécies descritas, e *Ureaplasma*, cinco espécies (TULLY et al., 1993). A principal

característica da família é a necessidade de esteróis para o seu desenvolvimento (BERGEY et al., 1994; RAZIN; TULLY, 1983).

Os micoplasmas e ureaplasmas os menores procariontes conhecidos, auto-replicantes, com tamanho variando de 0,3 até 0,8  $\mu\text{m}$ , formam colônias de aproximadamente 1 mm de diâmetro e se caracterizam pela ausência de parede celular (KIRKBRIDE, 1987). A ausência de parede celular determina a morfologia colonial em meio sólido em forma de "ovo-frito". Estes agentes necessitam de atmosfera com concentração de 5 a 15% de dióxido de carbono para apresentar crescimento satisfatório em meios de cultura artificiais.

Os *Mollicutes* apresentam metabolismo e vias biossintéticas limitadas em função do reduzido genoma (580 à 2200 kb) da maioria das espécies. Desta maneira o seu cultivo exige meios enriquecidos, contendo precursores para a biossíntese do ácido nucléico, proteínas e lipídios (ROSEMBUSH, 1994).

O *Ureaplasma diversum* é a única espécie do gênero descrita em bovinos (HOWARD, 1984) e inclui três sorotipos (A, B e C) aos quais são atribuídos graus distintos de patogenicidade (HOWARD et al., 1973; RUHNKE et al., 1984). Os sorotipos também podem ser caracterizados como *Ureaplasma diversum* A417 (sorotipo A), D48 (sorotipo B) e T44 (sorotipo C).

### 3.3 PATOGENIA

As doenças desencadeadas por *Mycoplasma* spp e *U. diversum* são conhecidas genericamente por micoplasmoses. Estes agentes ocorrem predominantemente na cavidade oral, tratos respiratório e urogenital de várias espécies animais e de humanos.

Algumas espécies de *Mycoplasma*, assim como *Ureaplasma diversum*, estão comprovadamente envolvidas em casos de vesiculite seminal, balanopostite, epididimite (PILASZEK; TRUSZCZYNSKI, 1988) e outras patologias responsáveis por alterações morfológicas e funcionais dos espermatozóides (EAGLESOME et al., 1992; PANANGALA et al., 1981), como diminuição da motilidade que resulta em baixa qualidade do sêmen (DOIG, 1981b; EAGLESOME et al., 1992; FISH et al., 1985; HALL; MCENTEE, 1981; HUFFMAN et al., 1985; JASPER, 1987; KIRKBRIDE, 1987; RAE et al., 1995).

A inflamação da vesícula seminal ocasionalmente resulta em sinais sistêmicos que podem ser confundidos com peritonite de outras origens (TIMONEY et al., 1998). Touros de qualquer idade podem desenvolver a doença porém, a incidência da infecção é maior em animais jovens criados em grupos devido à atividade de monta freqüentemente observada entre os mesmos, o que permite a contaminação do prepúcio e do pênis, que pode resultar em infecção ascendente.

Ureaplasmas colonizam as membranas celulares (espermatozóides, zona pelúcida embrionária, célula endometrial) e interferem com a espermatogênese, transporte espermático e capacidade de fecundação (EAGLESOME et al., 1992; KIRKBRIDE, 1987). Estas manifestações apresentam reconhecida importância quando do controle reprodutivo em propriedades economicamente exploradas, pois

podem causar redução em diferentes níveis da produção com conseqüente prejuízo econômico (RUHNKE; ROSENDAL, 1994).

Um dos mecanismos de patogenicidade de micoplasmas e ureaplasmas é o alto grau de especificidade e capacidade de aderência às células do hospedeiro, com preferência pelas células mesenquimatosas que revestem as cavidades serosas, articulações e membranas dos sistemas respiratório, digestivo e urogenital (HOWARD, 1984). Ureaplasmas exercem seu poder lesivo tecidual através da produção de amônia (MILLER et al., 1994) que leva a perda da atividade ciliar e a destruição das células do oviduto e do endométrio (THORNBURGH, 1982).

Os micoplasmas e ureaplasmas modificam rapidamente a natureza e estrutura dos componentes de sua membrana de superfície. Esta rápida modificação se deve ao mecanismo de expressão dos genes codificadores de antígenos, que determina a variabilidade nas proteínas de superfície. Esta característica lhes confere resistência à tentativa de destruição pelos sistemas de defesa do hospedeiro (POUMARAT et al., 1997) e pode ser este, um dos fatores relacionados a cronificação da doença. Além desta característica de resistência, sabe-se que o exsudato fibrinoso presente nas infecções os protege da ação dos anticorpos e das drogas antimicrobianas, permitindo a instalação e manutenção da doença, que muitas vezes torna-se crônica (EICHWALD et al., 1973).

As diferentes espécies de micoplasmas apresentam mecanismos distintos de patogenicidade. Causam uma série de reações imunológicas que conduzem a alterações imunopatológicas. A formação de complexo imunológico provoca reações inflamatórias (NICOLET, 1986).

O *M. bovis* é reconhecido patógeno e causa endometrite, salpingite, ooforite, abortamento e vesiculite seminal. É também um importante agente de mastite, artrite

e pneumonia (RUHNKE; ROSENDAL, 1994). HIRTH et al. (1966), observaram que 10 de 12 novilhas inseminadas com sêmen contaminado pelo agente, apresentaram vários episódios de repetição de cio e à necropsia, em quatro de oito animais, foram observados graus variados de salpingite supurativa crônica, endometrite crônica e adesão ovariana.

O *Mycoplasma bovigenitalium* é uma espécie freqüentemente encontrada no trato genital bovino e causa infertilidade, endometrite necrotizante, vesiculite seminal e problemas na motilidade espermática (RUHNKE; ROSENDAL, 1994). As infecções genitais causadas pelo agente em fêmeas, são caracterizadas por vulvovaginite granular, com descarga vaginal mucopurulenta, podendo ou não apresentar infertilidade. Mastite e abortamento também são relatados (EAGLESOME et al., 1992). O microrganismo, como comensal do trato reprodutivo posterior, pode ser introduzido no útero através da inseminação artificial ou monta natural e causar endometrite, interferindo com a implantação ou mesmo resultando em morte embrionária (MILLER et al., 1994).

A transmissibilidade venérea dos micoplasmas e ureaplasmas para fêmeas sãs, através de partidas de sêmen contaminado, é de relevante importância. Quando dois touros naturalmente infectados com *M. bovigenitalium* foram utilizados para servir 17 novilhas não infectadas previamente, 14 fêmeas tornaram-se positivas à cultura em um intervalo de 21 dias (KIRKBRIDE, 1987).

*Mycoplasma* spp e *U. diversum* têm distribuição mundial e podem ser disseminados através do comércio internacional de animais, sêmen industrializado e recentemente, de produtos de transferência de embriões (BRITTON et al., 1988; DOIG et al., 1981b; MILLER et al., 1994).

O estudo do gênero *Ureaplasma* tem grande importância na Medicina Humana. O *Ureaplasma urealyticum* é agente de sérias patologias urogenitais: uretrites não-gonocócicas, cistites, abortamentos, placentites, diminuição da capacidade reprodutiva e alterações na qualidade seminal, são problemas observados freqüentemente (QUINN et al., 1983; TAYLOR-ROBINSON; MCCORMACK, 1980).

O *Ureaplasma diversum*, até o momento encontrado somente em bovinos, é habitante dos tratos respiratório e genital, participando da etiologia de problemas reprodutivos como: vulvovaginite, salpingite, endometrite, abortamento, retenção de placenta, infertilidade em fêmeas e vesiculite seminal e epididimite em machos (DOIG et al., 1981a; EAGLESOME et al., 1992; KIRKBRIDE, 1987; THORNBUR, 1982). Esta espécie também foi citada como responsável por morte neonatal (RUHNKE, 1984; MILLER et al., 1983).

Casos de Vulvovaginite Granular aguda por *U. diversum* têm sido associados à severa queda nas taxas de concepção no primeiro serviço em rebanhos que utilizam inseminação artificial. O agente pode ser introduzido no útero pelo uso de sêmen contaminado ou ser carregado ao longo da cervix pela pipeta de inseminação (KIRKBRIDE, 1987).

A aderência dos microrganismos interfere na espermatogênese, transporte espermático, capacitação e fecundação. Além disso, espermatozóides podem atuar como vetores na transmissão dos agentes, já que os antibióticos rotineiramente utilizados em Centrais de Inseminação não agem sobre micoplasmas e ureaplasmas (RAE et al., 1995).

As vias de eliminação de micoplasmas e ureaplasmas são secreções orgânicas, especialmente sêmen, mucos prepucial e vaginal, secreção conjuntival e

leite. A transmissão ocorre por contágio indireto, através de equipamentos contaminados como pipetas de inseminação e teteiras de ordenha. No entanto, do ponto de vista econômico, a principal forma de transmissão é o contágio direto pelo coito, onde touros infectados disseminam os agentes através da monta natural ou inseminação artificial (BRITTON et al., 1988; KIRKBRIDE, 1987; MILLER et al., 1994).

A cavidade prepucial parece ser o principal ponto para a contaminação do sêmen em touros quando a colheita de sêmen é efetuada com vagina artificial. Entretanto, foi demonstrado que em alguns animais a uretra também é altamente colonizada, sugerindo que os procedimentos instituídos para reduzir o número de organismos no prepúcio, podem não ser totalmente efetivos para eliminar a contaminação do sêmen (DOIG, 1981a).

A transmissão placentária de *Mycoplasma* foi descrita por STONE et al., em 1969. Posteriormente, foi relatado o isolamento de *Mycoplasma* spp em fetos abortados e anexos fetais (KAPOOR et al., 1989; TRICHARD; JACOBSZ, 1985).

Usualmente os micoplasmas e ureaplasmas são introduzidos nas propriedades rurais através da compra de animais em rebanhos infectados ou quando do retorno à propriedade de animais que adquiriram a infecção em exposições e leilões (HUFFMAN et al., 1985).

O potencial para difusão internacional destes agentes através da comercialização de material genético é uma importante consideração (RUHNKE; ROSENDAL, 1994).

A importância de *Mycoplasma* spp e *U. diversum* em sêmen de touros de campo e de central de inseminação (CI) é caracterizada pela interferência com a maturação espermática e diminuição da resistência do espermatozóide ao choque



causado pelo congelamento e descongelamento. Infecções dos testículos ou epidídimo podem resultar em alterações morfológicas (ultra-estrutural) no espermatozóide e a motilidade pré-congelamento pode diminuir (KIRKBRIDE, 1987).

Panangala et al.(1981) constataram que após 72 horas de contato com esperma, o *M. bovis genitalium* adere-se ao acrossomo e à cauda dos espermatozóides, provocando a sua imobilização.

Jurmanova e Sterbova, em 1977, constataram a existência de associação significativa entre baixa motilidade dos espermatozóides e a contaminação do sêmen por *Mycoplasma* spp, caracterizada por redução da motilidade (ao redor de 60%) e viabilidade de espermatozóides de bovinos como consequência da adsorção de micoplasmas ou ureaplasmas.

A associação entre aderência microbiana e motilidade espermática foi observada em homens inférteis, onde infecções genitais por *Ureaplasma urealyticum* têm sido relacionadas à diminuição de motilidade espermática e anormalidades citológicas. Os ureaplasmas são encontrados principalmente no colo espermático e quando a infecção é debelada, observa-se aumento na motilidade e diminuição da porcentagem de anomalias espermáticas. É possível que em condições naturais, o contato entre esperma e micoplasma não ocorra após a ejaculação, mas no epidídimo. A aderência ao esperma pode interferir com o processo essencial de maturação (FRIBERG, 1980).

Quando o *M. bovis genitalium* adere-se aos espermatozóides bovinos e anticorpos contra antígenos de micoplasmas estão presentes, a aglutinação espermática pode ocorrer (TIMONEY et al., 1998). A adição de suspensão de *Mycoplasma bovis genitalium* ao sêmen bovino determinou uma redução na motilidade dos espermatozóides após 48 à 72 horas, e este efeito foi dose dependente (DOIG;

RUHNKE, 1986). Algumas estirpes de *M. bovigenitalium* parecem ser capazes de suprimir a motilidade espermática associado ou não a evidências clínicas de doença.

A presença de sulfoglicolipídicos na membrana espermática foi associada à um receptor específico para *U. diversum* isolado de bovinos (LINGWOOD et al., 1990).

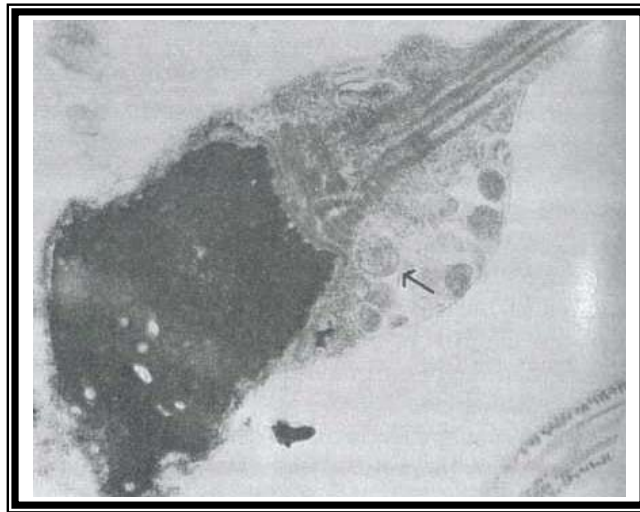


Figura 1 - Microscopia eletrônica de transmissão com células de *Ureaplasma urealyticum* aderidas ao colo de um espermatozóide humano (X 36.000). (FRIBERG, 1980)

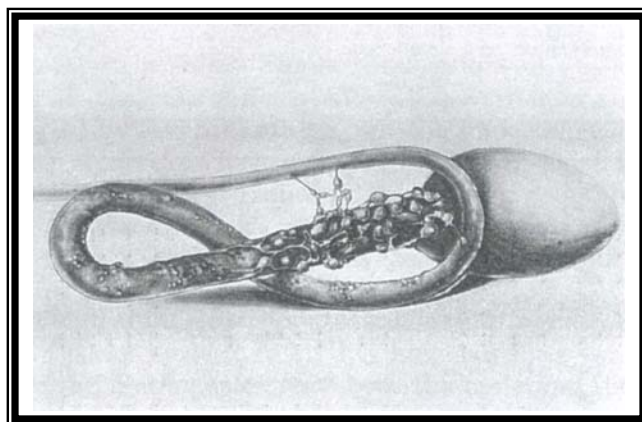


Figura 2 - Desenho esquemático de um espermatozóide apresentando colônias de *U. urealyticum* no colo e na parte anterior da cauda (FRIBERG, 1980)

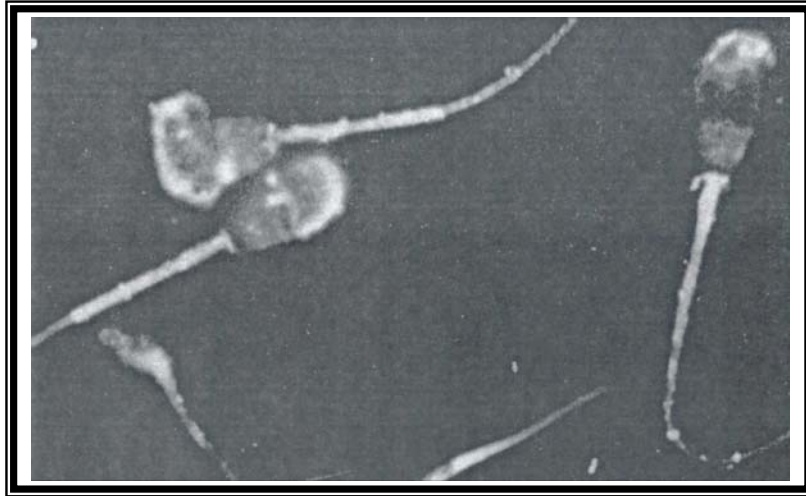


Figura 3 - Espermatozoides bovinos sob imunofluorescência apresentando *Mycoplasma bovis* aderidos ao acrossomo e colo (PANANGALA et al., 1981)

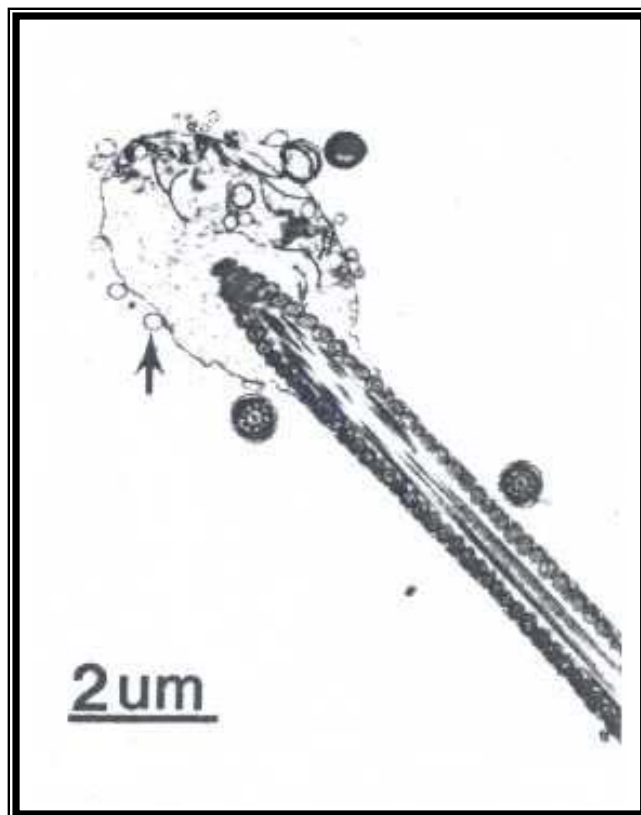


Figura 4 - Microscopia eletrônica de espermatozóide bovino apresentando estruturas semelhantes à *Mycoplasma* aderidas ao acrossomo (PANANGALA et al., 1981)

### 3.4 DIAGNÓSTICO

Os métodos utilizados para a detecção de *Mycoplasma* spp e *U. diversum* estão restritos a técnicas de isolamento e identificação sorológica das estirpes isoladas (Imunoperoxidase, Imunofluorescência e ELISA), no entanto estes procedimentos são demorados, de difícil observação e dispendiosos (KUPPEVELD et al., 1992; SIMECKA et al., 1992). Apesar do isolamento ser o método de escolha, pois possibilita a visualização dos microrganismos, o mesmo é afetado pela presença de bactérias oportunistas usualmente presentes quando das colheitas efetuadas a campo. O tempo decorrido entre a colheita e o processamento laboratorial, também pode afetar a viabilidade dos microrganismos, o que prejudica o cultivo em meios artificiais. Estes fatores têm determinado a implementação de técnicas mais rápidas, sensíveis e específicas (CARDOSO et al., 2000).

O isolamento bacteriológico permite a detecção de diferentes estirpes de *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum*. No entanto diversas estirpes de *Mycoplasma* isoladas não podem ser diferenciadas em espécie através desta técnica, já que a morfologia colonial é muito semelhante. O resultado final, é considerado positivo para o gênero *Mycoplasma*, quando não há disponibilidade para tipificação sorológica ou molecular das estirpes. Já para a espécie *Ureaplasma diversum*, essa tipagem não se torna necessária, pois é a única espécie de *Ureaplasma* encontrada em bovinos.

As técnicas moleculares, como a PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), têm sido um grande avanço para o diagnóstico das micoplasmoses, pois além de detectarem estirpes inviáveis para o isolamento, requerem pequenas quantidades de DNA presentes na amostra clínica a ser analisada (ANDRADE, 1993; FARAH, 1997;

GHADERSOHI et al., 1997).

A principal vantagem da PCR é a possibilidade de ser realizado o diagnóstico em pequenas quantidades de DNA. Embora rotineiramente seja utilizado 0,5 µg de DNA genômico na amostra clínica, a técnica pode ser eficaz, mesmo se realizada a partir de uma molécula de DNA proveniente de uma única célula. A possibilidade da amplificação de um gene específico, como os genes de uma bactéria, por meio da PCR, poderá vir a dispensar os métodos diagnósticos clássicos até então utilizados (FARAH, 1997). Esta técnica poderá ser de grande utilidade para o diagnóstico das micoplasmoses, pois cobre as falhas existentes nos métodos convencionais de cultivo bacteriano, através da detecção de células viáveis ou inviáveis, em menor tempo. Estas características poderão agilizar o diagnóstico laboratorial, possibilitando ao clínico de campo a rápida implantação de uma estratégia para o controle da doença.

Combinando-se o *primer* MGSO selecionado a partir da região 16Sr RNA com o oligonucleotídeo procariótico GPO-1, amplifica-se um fragmento de 715 pares de bases, o qual está presente em todos os organismos da classe *Mollicutes* (KUPPEVELD et al., 1992). No presente trabalho, estes primers foram utilizados com a intenção de testar sua eficiência em um processo de triagem das amostras clínicas, independentemente da utilização dos *primers* espécie-específicos.

Cardoso, em 1998, empregou a técnica de PCR, com *primers* obtidos da região 16S rRNA e condições de estringência específicas, para a pesquisa de *U. diversum* em muco vulvovaginal bovino. Através da PCR foram classificados como positivos 52,9% de 168 fêmeas estudadas, enquanto que pelo isolamento a taxa de detecção foi de 35,7%.

Um dos poucos trabalhos comparativos enfocando a detecção de micoplasmas através da PCR e de métodos de isolamento utilizando *swabs* penianos, pré-ejaculados e sêmen de 438 eqüinos, relatou taxa de 80% (352/438) de positivos pela PCR e 29% (125/438) pelo isolamento, mostrando uma diferença considerável (SPERGSER et al., 2002), no entanto, estas discrepâncias estão de acordo com relatos que descrevem uma baixa sensibilidade para as técnicas de isolamento de micoplasmas a partir de amostras clínicas quando comparadas aos métodos moleculares (SPERGSER et al., 2002).

### **3.5 TERAPIA**

A ausência de recursos imunoproláticos efetivos contra as micoplasmoses genitais, determina que o controle destas enfermidades dependa de medidas de higiene e de procedimentos sanitários, incluindo-se a segregação de animais infectados (PATHAK; GARG, 1988). Visto isso, a utilização de procedimentos que minimizem a transmissão dos agentes deve ser adotada; o uso de pipetas de inseminação duplas e/ou de preservativos de inseminação têm sido preconizados (EAGLESOME et al., 1992)

Os antibióticos têm sido adicionados aos diluentes de sêmen desde a década de 40 e nesse período foram capazes de destruir *Campylobacter* no sêmen. Atualmente esta bactéria passou a ser rara e o processo de congelamento de sêmen está disseminado em todo o mundo, no entanto, a estreptomicina e a penicilina continuam a ser utilizadas (PAREZ, 1985).

A preocupação com o controle sanitário de partidas de sêmen industrializado, nas centrais de inseminação, tem gerado pesquisas onde novas combinações de antibióticos têm sido testadas com a intenção de controlar *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Haemophilus somnus*. A associação lincomicina, espectinomicina, tilosina e gentamicina adicionados ao sêmen fresco e também a diluidores tendo o leite não glicerinado como base e, em gema de ovo, foi capaz de controlar *M. bovis*, *M. bovigentialium* e *Ureaplasma* spp (SHIN et al., 1988). A lincospectina e a espectinomicina foram adicionados aos conservantes para controlar micoplasmas; esta mesma combinação não se apresentou efetiva contra ureaplasma (BALL et al., 1987).

Visser et al. (1995) testaram duas combinações de antibióticos em sêmen congelado contra *Haemophilus somnus*, *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*, *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum*. A combinação de diferentes concentrações de gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina foi comparada com penicilina, estreptomicina, lincomicina e espectinomicina (PELE). A combinação PELE reduziu significativamente o nível de *U. diversum* após oito dias de congelamento, porém, contra *M. bovis*, nenhuma das duas combinações apresentou resultados significantes.

A suplementação de conservantes com minociclina para sêmen a base de leite tem sido favorável para o controle de micoplasmas e ureaplasmas, sem prejudicar a qualidade espermática (DOIG, 1981a).

A combinação de lincomicina, espectinomicina e tilosina foi ativa contra ureaplasmas *in vitro* (TRUSCOTT; RUHNKE, 1984), assim como o tiamulin foi efetivo no controle de ureaplasma em sêmen (AHMAD et al., 1987).

A campo, touros têm sido tratados para micoplasma e ureaplasma com descanso sexual e lavados prepuciais, com a intenção de diminuir a possibilidade de transmissão de micoplasmas e ureaplasma e de melhorar as condições de fertilidade (DOIG, 1981a), entretanto, até o momento, não é conhecido um tratamento efetivo para eliminar o estado de portador de micoplasmas e ureaplasmas em touros (DOIG, 1981a; KIRKBRIDE, 1987).

Para a implementação de métodos apropriados de tratamento é necessário o conhecimento das características da doença. Desta forma, a falta de dados sobre as micoplasmoses da reprodução pode estar prejudicando o seu controle no país. Os clínicos de campo praticamente desconhecem a presença destes microrganismos nos rebanhos brasileiros, fato que pode estar contribuindo para a sua manutenção nos plantéis.

As formas de controle indicadas para as micoplasmoses reprodutivas são a antibioticoterapia local, preventiva para as infecções genitais nas fêmeas, e sistêmica para os casos de infecções em machos. A ausência de parede celular, característica dos *Mycoplasmatales*, indica a utilização de antibióticos cuja ação seja sobre a síntese protéica. As drogas preconizadas têm sido tartarato de tilosina, oxitetraciclina e fumarato de tiamulin (ALLAN; PIRRIE, 1981; HOLZMANN et al., 1984; LORTON et al., 1988; PICARD et al., 1984; STIPKOVITS et al., 1984; TRUSCOTT et al., 1975). O enrofloxacin foi utilizado com bons resultados práticos (MILLER et al., 1994), porém a sua eficácia específica contra os micoplasmas que habitam o sistema urogenital de bovinos e contra *Ureaplasma diversum* ainda não foi comprovada. Tratamentos adequados para as condições do Brasil ainda não estão disponíveis.



Os antibióticos rotineiramente adicionados aos diluentes (penicilina e estreptomicina) não são efetivos para o controle de micoplasmas no sêmen. Truscott (1983) examinou a atividade de vários outros antibióticos e observou que a minociclina foi efetiva contra *Ureaplasma*, enquanto que associação de lincomicina (0,3mg/ml) e espectinomicina (0,6 mg/ml) foi efetiva contra *Mycoplasma*, sendo que os resultados podem ser prejudicados pelo tempo necessário de contato entre os antibióticos e o sêmen (15 min. a 35°C) e a influência do diluente, já que a minociclina é efetiva somente em diluentes a base de leite (PAREZ, 1985).

Ayling et al. (2000), mostraram uma maior atividade *in vitro* de danofloxacin contra estirpes de campo de *Mycoplasma bovis* que florfenicol, oxitetraciclina, espectinomicina e tilmicosin.

Stipkovits et al. (2001), testaram a valnemulina na forma de premix, uma pleuromutilina com excelente ação sobre micoplasmas, em animais de campo portando infecção respiratória onde *Mycoplasma bovis* foi detectado em 80% dos casos. O resultado no grupo tratado foi ganho de peso mais rápido, menores porcentagens de infecção por *Mycoplasma*, menores taxas de sintomas respiratórios além de menor requerimento de tratamentos com outros antibióticos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.1 PROPRIEDADES E CENTRAL DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Foram utilizadas quatro fazendas localizadas no município de Araçatuba, São Paulo, que possuem touros reprodutores criados a campo, de diferentes raças com aptidão para corte.

A central de inseminação estudada, localiza-se no Estado de São Paulo, e mantém bovinos de diferentes raças, criados em confinamento para colheita intensiva de sêmen.

### 4.2 ANIMAIS

**Grupo 1.** Setenta e três animais criados a campo dos quais foram colhidas 105 amostras de muco prepucial e 79 amostras de sêmen.

**Grupo 2.** Trinta e seis animais mantidos em central de inseminação, dos quais foram colhidas 70 amostras de muco prepucial e 63 amostras de sêmen.

Todos os animais pesquisados não foram submetidos a tratamento prévio com antibióticos nos 15 dias anteriores a colheita.

### 4.3 MATERIAIS CLÍNICOS

Os materiais clínicos utilizados para detecção da presença de *M. bovis*, *M. bovigentialium* e *U. diversum* foram muco prepucial e sêmen *in natura*.

#### 4.3.1 COLHEITA

As amostras de muco de prepúcio foram colhidas utilizando-se *swabs* não alginados, introduzidos no orifício prepucial após tricotomia e higienização local com água corrente. Os *swabs* foram conservados em meio de transporte A<sub>3XB</sub> (CUNHA et al., 1987), e mantidos sob refrigeração (4°C) até o momento do processamento laboratorial, realizado em um período máximo de 48 horas.

As amostras de sêmen foram colhidas através de estimulação por eletro-ejaculador e mantidas sob refrigeração.

Foram definidos dois períodos distintos para colheita dos materiais clínicos, períodos pré-tratamento (de agosto de 1999 à julho de 2000) e pós-tratamento (de agosto de 2000 à julho de 2001), tendo sido realizadas as colheitas de acordo com a disponibilidade dos técnicos de campo envolvidos no trabalho.

#### 4.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial foi realizado através de dois métodos distintos de detecção bacteriana: o isolamento e a PCR.

##### 4.4.1 DETECÇÃO DE *Mycoplasma* spp E *U. diversum* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ISOLAMENTO

As amostras de muco prepucial e sêmen, foram semeadas em meios de cultura específicos para cultivo de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, ágares M (Hayflick) e U, caldos M e U, segundo Ruhnke e Rosendal, 1994.

Os ágares M e U foram friccionados com o *swab* e, posteriormente, a partir do meio de transporte contendo muco, o volume de 0,3 ml da suspensão foi utilizado para realização de três diluições decimais em caldos M e U, totalizando duas placas e seis tubos para leitura subsequente, por amostra clínica processada. As placas de agar foram incubadas por 15 dias, a 37°C em jarra de microaerofilia (GENOVEZ *et al.*, 1989), sob atmosfera de 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> (WHITE-MARTINS) e O<sub>2</sub> residual, após a remoção do ar do interior da jarra (-600 mmHg) utilizando-se bomba de vácuo. Os caldos foram incubados por até 15 dias a 37°C, em aerobiose.

As placas e os tubos foram observados diariamente por 15 dias consecutivos. As placas de agar foram lidas em lupa estereoscópica com aumento de 40X.

O crescimento de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* foi caracterizado através de morfologia colonial típica, quando do crescimento sobre agar. O crescimento nos caldos foi observado através da alteração da coloração dos mesmos (pela mudança

do pH, o caldo amarelo se torna róseo) e/ou através de sub-cultivos (caldo ⇒ agar) para confirmação do crescimento bacteriano.

Os cultivos positivos foram conservados sob congelamento (-70°C) para posterior caracterização das estirpes.

Foram consideradas negativas as culturas onde não foi observada alteração do pH do caldo e/ou não foram evidenciadas colônias características em agar.

#### **4.4.2 DETECÇÃO DE *Mycoplasma* spp e *U. diversum* ATRAVÉS DA PCR**

##### **4.4.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO**

O DNA genômico das amostras de muco prepucial foi extraído e purificado utilizando-se a técnica de Fenol - Clorofórmio (BARBEYRAC et al., 1996), a partir de 1 ml dos meios de transporte A<sub>3XB</sub> contendo as amostras clínicas dos animais. Para as amostras de sêmen, foi utilizada a técnica de extração de DNA CTAB (ROGERS e BENDICH, 1994).

##### **4.4.2.2 PRIMERS**

Foram utilizados *primers* desenhados especificamente para amplificar diferentes genes da região 16S rRNA das espécies estudadas.

Para detecção das espécies *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *U. diversum* foram utilizadas seqüências específicas de oligonucleotídeos para realização da PCR (CARDOSO et al., 2000; KOBAYASHI et al., 1997; SUBRAMANIAN et al., 1998) como apresentado na tabela 1.

Os resultados do teste de triagem com o par de primers MGSO/GPO-1 foram comparados aos resultados encontrados no isolamento bacteriano e nos testes das amostras clínicas com os *primers* espécie-específicos.

#### **4.4.2.3 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR)**

Para a execução da PCR foram utilizados os protocolos de Cardoso et al., 2000; Kobayashi et al., 1997; Kuppeveld et al., 1992; Subramanian et al., 1998.

Como controles positivos de reação foram utilizadas estirpes padrão ATCC (American Type Culture Collection). O controle negativo foi realizado com uma alíquota da mistura de reação sem aplicação de amostra clínica ou estirpe padrão.

Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio, para visualização em transiluminador.

#### **4.5 TRATAMENTOS**

Dois tratamentos foram propostos com o objetivo de eliminar a presença dos agentes e de analisar as possíveis alterações na qualidade do sêmen. Para tal, foram analisadas as amostras clínicas (muco prepucial e sêmen) nos momentos pré e pós-tratamento para a presença ou ausência dos agentes.

Para a implantação dos tratamentos os animais dos grupos 1 e 2 foram subdivididos como se segue:

**Grupo 1.** Reprodutores de campo, grupo de 73 animais, foram divididos em dois grupos (1A e 1B), de acordo com as fazendas às quais pertenciam.

**Grupo 1A.** Grupo de 32 animais tratados com a base medicamentosa oxitetraciclina (Oxit), em aplicação intramuscular, na dosagem única de 20 mg por kg de peso vivo, por animal.

**Grupo 1B.** Grupo de 41 animais tratados com a base fumarato de hidrogênio de tiamulin (Tiam), em aplicação intramuscular, na dosagem de 15 mg por kg de peso vivo, por animal, em três aplicações sucessivas, com intervalo de 24 horas entre aplicações.

Relativamente às amostras de muco prepucial, foram colhidas amostras pareadas, pré e pós-tratamento de 34 animais; para as amostras de sêmen, foram colhidas amostras de 24 animais.

**Grupo 2.** Os 36 animais da Central de Inseminação Artificial foram separados em dois grupos (2A e 2B), para análise do tratamento.

**Grupo 2A.** Grupo de 18 animais tratados com a base medicamentosa oxitetraciclina, em aplicação intramuscular, na dosagem única de 20 mg por kg de peso vivo, por animal.

**Grupo 2B.** Grupo de 18 animais tratados com a base fumarato de hidrogênio de tiamulin (Tiam), em aplicação intramuscular, na dosagem única de 15 mg por kg de peso vivo, por animal.

As amostras de muco prepucial pareadas pré e pós-tratamento foram colhidas de 34 animais, enquanto que amostras de sêmen pareadas foram colhidas de 29 animais.

#### **4.6 EXAMES ANDROLÓGICOS**

Os exames andrológicos foram realizados durante as colheitas das amostras clínicas dos animais, nas diferentes propriedades e na Central de Inseminação Artificial.

Foram analisados parâmetros do exame andrológico dos touros em função de sua associação a variações potencialmente patológicas da qualidade seminal.

Os parâmetros armazenados para avaliação da qualidade seminal dos touros dos dois grupos, 1 e 2 foram: motilidade, vigor, concentração e presença de patologias espermáticas, ou seja, defeitos maiores, menores e totais, nos momentos, pré e pós-tratamento. Estes parâmetros foram avaliados de acordo com os padrões andrológicos para sêmen bovino, aprovados pelo Ministério de Agricultura e Abastecimento, Portaria SDR, número 26 de 05/09/1996<sup>3</sup>. De acordo com esta Portaria, os valores médios dos parâmetros analisados são:

- 1) motilidade 70%;
- 2) vigor 3;
- 3) concentração  $7 \times 10^9$ ;
- 4) espermatozóides normais 80%.

---

<sup>3</sup> COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998.



## 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As provas de McNemar (SIEGEL, 1975), utilizando  $\chi^2$ , tabela 2 x 2, e Índice Kappa (MACLURE; WILLET, 1987) foram utilizadas para análise comparativa entre as técnicas de Cultivo e PCR, adotando-se o nível de confiança de 0,05.

A eficiência comparativa das técnicas de PCR e cultivo, foi estabelecida com os índices relativos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos (GALEN; GAMBINO, 1975).

A Odds Ratio, OR (SMITH, 1990), foi calculada para o estudo da relação entre a positividade para os microrganismos, segundo a técnica de detecção utilizada, e os diferentes parâmetros de manejo (animais com menos que quatro anos de idade, animais com mais que quatro anos de idade, animais que passam por lavagem prepucial na colheita do sêmen e animais que entram em monta natural). A Odds Ratio também foi utilizada para análise da qualidade seminal dos touros associada à presença dos microrganismos.

Como na análise de Risco Relativo, um OR maior que 1 (um) indica uma associação estatística positiva entre a idade dos animais e o manejo reprodutivo, e a positividade para os microrganismos.

A análise estatística para o estudo da eficiência dos tratamentos frente à qualidade seminal dos touros da CI, foi realizada pelo *Software* SPSS for Windows, v. 9.0, empregando-se teste de Wilcoxon, para análise intragrupos e Mann-Whitney, para análise intergrupos.

Tabela 1 - Seqüências de nucleotídeos (*primers*) para PCR utilizados para amplificação *in vitro*

<b>Espécie</b>	<b>Primer</b>	<b>Seqüência</b>
<b><i>Mollicutes</i></b> (715 bp)	MGSO	5' - TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC - 3'
	GPO-1	5' - ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A - 3'
<b><i>M. bovis</i></b> (215 bp)	<i>Mb1</i>	5' - AAG GTA CAC CAG CTA ACC CAG - 3'
	<i>Mb2</i>	5' - GAT CAC TTT TTG GAA ACT TAT - 3'
<b><i>M. bovigenitalium</i></b> (312 bp)	Mbg F	5' - CGT AGA TGC CGC ATG GCA TTT ACG G - 3'
	Mbg R	5' - CAT TCA ATA TAG TGG CAT TTC CTA C - 3'
<b><i>U. diversum</i></b> UD <sub>1-2</sub> = 986 bp UD <sub>3-4</sub> = 215 bp	UD <sub>1</sub>	5' - CCG GAT AAT AAC ATT TAC TT - 3'
	UD <sub>2</sub>	5' - TCG ATA CTG CTA CCG CAA GG - 3'
	UD <sub>3</sub>	5' - AAT GTC GGC TCG CTT ATG AG - 3'
	UD <sub>4</sub>	5' - GCG GAG GTT AAC AAT ATG ACA GG - 3'

## 5 RESULTADOS

---

O presente estudo das micoplasmoses, desenvolvido em quatro propriedades rurais, localizadas na macroregião de Araçatuba, e em uma central de inseminação artificial, localizada no Estado de São Paulo, teve a duração de, aproximadamente, quatro anos. As colheitas dos materiais clínicos, muco prepucial e sêmen, foram realizadas em dois momentos, pré e pós-tratamentos dos animais.

Os resultados obtidos, segundo os grupos experimentais, e as propostas definidas, foram distribuídos em 14 tabelas e dois gráficos, apresentados a seguir.

### 5.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

#### 5.1.1 Isolamentos e PCR

As porcentagens de detecção de *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* obtidas pelo isolamento, são apresentadas na tabela 2.

Na tabela 3, constam os resultados da detecção de *Mycoplasma* spp, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* de obtidos pela técnica de PCR.

A tabela 4 apresenta as frequências de detecção de *Mycoplasma* spp e *U. diversum* por isolamento e PCR.

Os gráficos 1 e 2 ilustram as diferenças de frequências obtidas no diagnóstico de *Mycoplasma* spp e *U. diversum* quando o isolamento e a PCR foram utilizadas.

O *M. bovis* foi detectado através da PCR em somente uma amostra de muco prepucial, de animal pertencente ao grupo 2.

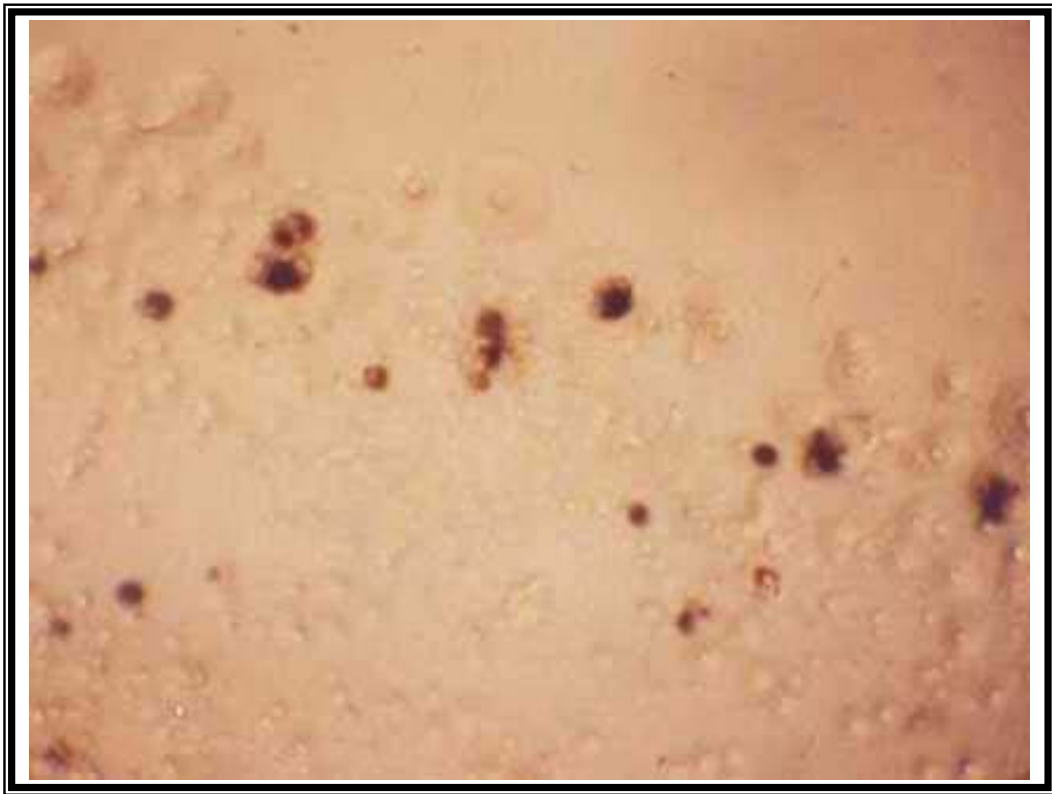


Figura 5 - Cultivo de muco prepucial bovino apresentando crescimento de *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* (X 20).

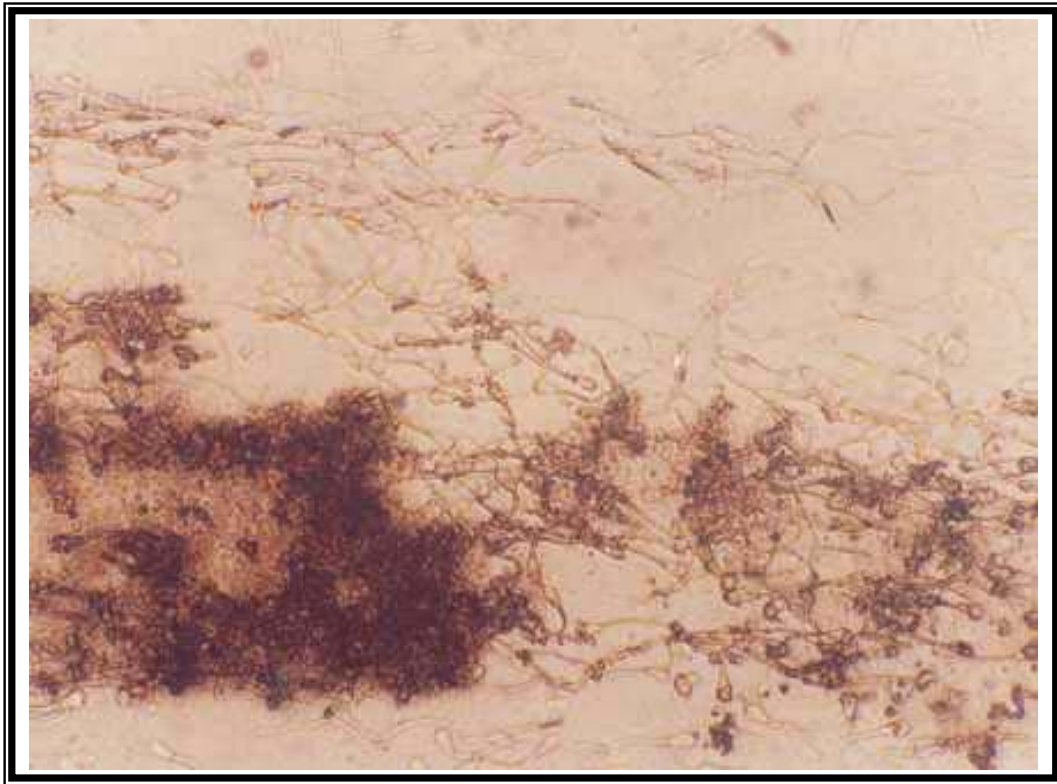


Figura 6 - Cultivo de sêmen bovino apresentando crescimento de *Ureaplasma diversum* (X 20).

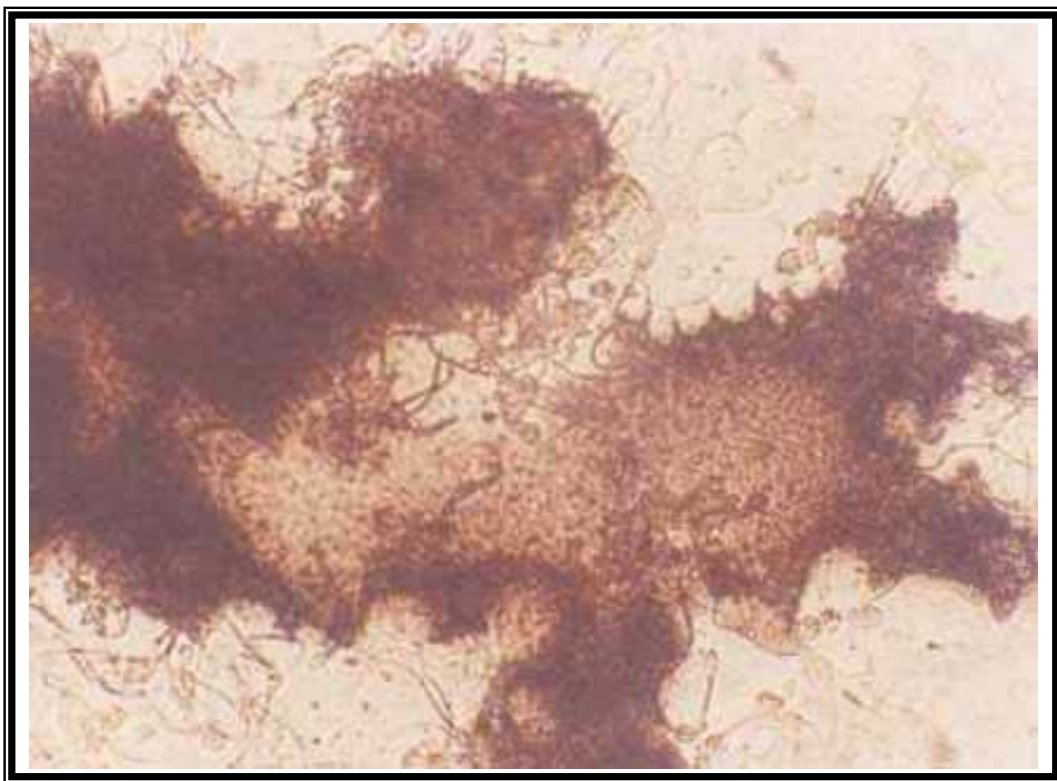


Figura 7 - Cultivo de sêmen bovino apresentando presença de polimorfonucleares e crescimento de *Ureaplasma diversum* (X 20).

### 5.1.2 Avaliação da eficiência do sistema MGSO/GPO-1 frente ao isolamento bacteriano

A eficiência do sistema MGSO/GPO-1 e dos *primers* espécie-específicos (Mbg e UD) utilizados na PCR, analisada pelos testes de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, índice Kappa e  $\chi^2$  de McNemar, nas amostras de muco prepucial e sêmen, pode ser observada nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

No diagnóstico de muco prepucial, os valores de  $p \geq 0,05$  foram encontrados na utilização do *primer* Mbg (*M. bovis genitalium*) frente ao isolamento de *Mycoplasma* spp e do sistema MGSO/GPO-1, frente ao isolamento de *U. diversum*. Para o sêmen,  $p \geq 0,05$  foi observado no sistema MGSO/GPO-1 frente ao isolamento de *Mycoplasma* spp e frente à PCR para *M. bovis genitalium*; na utilização dos *primers* para *M. bovis genitalium* e *U. diversum* frente aos isolamentos de *Mycoplasma* spp e *U. diversum*, respectivamente.

## 5.2 ESTIMATIVA DE RISCO SEGUNDO A IDADE DOS TOUROS E O TIPO DE MANEJO REPRODUTIVO

Nas tabelas 7 e 8, constam os resultados obtidos pelo teste Odds Ratio (OR), ao qual foram submetidos os dados dos diferentes grupos propostos, idade e manejo reprodutivo, em função da presença de *Mycoplasma* spp, *M. bovis genitalium* e *U. diversum*, detectados pelas técnicas de isolamento PCR, adotando-se intervalo de confiança de 95%, em muco prepucial e sêmen.

Em muco prepucial, OR maior que 1 (um) foi observada nos animais com menos de quatro anos, em todos os diagnósticos propostos, apesar de não ter sido encontrada significância estatística nesta associação ( $p>0,05$ ), e em animais que entram em estação de monta natural, onde foi observado  $p=0,0001$  para todos os diagnósticos.

Em sêmen,  $OR>1$  foi observada em animais com menos de quatro anos, na maioria dos diagnósticos, e em animais de com mais de quatro anos (PCR para *Mycoplasma* spp e para *M. bovis genitalium*). Animais que entram em estação de monta apresentaram associação à presença dos microrganismos em todos os diagnósticos propostos sendo que, uma estimativa de risco de 18,29 foi observada no PCR para *M. bovis genitalium* nestes animais.

### **5.3 EFICIÊNCIA DA ANTIBIOTICOTERAPIA**

A eficiência dos tratamentos, onde foram utilizadas as drogas oxitetraciclina di-hidratada e fumarato de hidrogênio de tiamulin, nos diferentes grupos, foi analisada com base em sua atuação sobre a qualidade seminal, segundo os parâmetros vigor, motilidade, concentração, defeitos maiores, menores e totais.

Para análise estatística os dados foram analisados em conjunto, ou seja, os animais sofreram tratamento (independentemente do tipo de tratamento) ou fragmentados em dois grupos segundo o tipo de tratamento, oxitetraciclina e tiamulin.

Os resultados são apresentados nas tabelas 9, 10, 11 e 12.

As frequências dos agentes em ambos os materiais clínicos, muco prepucial e

sêmen, associados ou não, são apresentados na tabela 13.

#### **5.4 ESTIMATIVA DE RISCO PARA A QUALIDADE DO SÊMEN**

As tabelas 14 e 15 apresentam as Odds Ratio, calculadas para o estudo da associação entre a presença de *Mycoplasma* spp ou *M. bovis genitalium* ou *U. diversum*, e a qualidade do sêmen, segundo os parâmetros vigor, motilidade, concentração, defeitos maiores, menores e totais.



Tabela 2 - Cultivos para isolamento de *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* em bovinos, segundo o grupo experimental, o material clínico e o microrganismo investigado. São Paulo, 1999 – 2002

Grupos <sup>1</sup>	Muco Prepuccial		Sêmen	
	<i>Mycoplasma</i> spp (%) <sup>2</sup>	<i>U. diversum</i> (%)	<i>Mycoplasma</i> spp (%)	<i>U. diversum</i> (%)
<b>1</b>	61/105 (58,1)	82/103 (79,6)	21/79 (26,6)	52/80 (65,0)
<b>2</b>	18/70 (25,7)	33/70 (47,1)	11/63 (17,5)	22/63 (34,9)
<b>Total</b>	79/175 (45,1)	115/173 (66,5)	32/142 (22,5)	74/143 (51,7)

<sup>1</sup> Grupo 1: reprodutores de campo

Grupo 2: reprodutores de central de inseminação

<sup>2</sup> Proporção: número de positivos/número de examinados

Tabela 3 - Exames de PCR para *Mycoplasma* spp ou *M. bovis genitalium* ou *Ureaplasma diversum* em bovinos, segundo o tipo de material clínico, o grupo experimental e o tipo de *primer* empregado. São Paulo, 1999 – 2002

Grupos		1 <sup>1</sup>	2	Total
		Positivos/ total (%)	Positivos/ total (%)	Positivos/ total (%)
Mucos Prepuciais	MGSO/GPO-1	80/104 (76,9)	29/67 (43,3)	109/171 (63,7)
	<i>M. bovis genitalium</i>	57/101 (56,4)	15/68 (22,1)	72/169 (42,6)
	<i>U. diversum</i>	86/101 (85,1)	38/69 (55,1)	124/170 (72,9)
Sêmen	MGSO/GPO-1	27/76 (35,5)	6/61 (9,8)	33/137 (24,1)
	<i>M. bovis genitalium</i>	32/74 (43,2)	2/50 (4,0)	34/124 (27,4)
	<i>U. diversum</i>	59/77 (76,6)	14/52 (26,9)	73/129 (56,6)

<sup>1</sup> Grupo 1: reprodutores de campo

Grupo 2: reprodutores de central de inseminação

<sup>2</sup> Proporção: número de positivos/número de examinados

Tabela 4 - Comparação entre as freqüências de detecção de *Mycoplasma* spp ou *U. diversum* por isolamento e PCR, segundo o material clínico e o grupo estudado. São Paulo, 1999-2002

Grupos	Muco Prepucial				Sêmen			
	<i>Mycoplasma</i> spp (%)		<i>U. diversum</i> (%)		<i>Mycoplasma</i> spp (%)		<i>U. diversum</i> (%)	
	Isol <sup>1</sup> .	PCR <sup>2</sup>	Isol.	PCR	Isol.	PCR	Isol.	PCR
<b>1</b>	58,1	76,9	79,6	85,1	26,6	35,5	65,0	76,6
<b>2</b>	25,7	43,3	47,1	55,1	17,5	9,8	34,9	26,9

<sup>1</sup> Isolamento

<sup>2</sup> Reação da polimerase em cadeia

Tabela 5 - Análise comparativa entre o isolamento bacteriano e a PCR, técnicas utilizadas para detecção de *Mycoplasma* spp ou *M. bovigenitalium* ou *Ureaplasma diversum* em muco prepuccial bovino. São Paulo, 1999 - 2002

Técnicas testadas	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VP+ <sup>1</sup> (%)	VP- <sup>2</sup> (%)	Teste Kappa	$\chi^2$ (McNemar) <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
PCR MGSO/GPO-1 e Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	76,62	46,81	54,13	70,97	0,2258	14,13	0,0002
PCR <i>M. bovigenitalium</i> e Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	49,35	63,44	52,78	60,20	0,1286	0,22	0,6397
PCR MGSO/GPO-1 e Isolamento <i>U. diversum</i>	75,22	58,93	78,70	54,10	0,3340	0,31	0,5754
PCR <i>U. diversum</i> e Isolamento <i>U. diversum</i>	85,84	44,64	75,78	60,98	0,3269	4,17	0,0411
PCR <i>M. bovigenitalium</i> e PCR MGSO/GPO-1	57,80	86,44	88,73	52,58	0,3854	25,35	0,0000

<sup>1</sup> Valor Preditivo Positivo

<sup>2</sup> Valor Preditivo Negativo

<sup>3</sup> Qui-Quadrado de McNemar

<sup>4</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

Tabela 6 - Análise comparativa entre o isolamento bacteriano e a PCR, técnicas utilizadas para detecção de *Mycoplasma* spp ou *M. bovigenitalium* ou *Ureaplasma diversum* em sêmen bovino. São Paulo, 1999 - 2002

Técnicas testadas	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VP+ <sup>1</sup> (%)	VP- <sup>2</sup> (%)	Teste Kappa	$\chi^2$ (McNemar) <sup>3</sup>	p <sup>4</sup>
PCR MGSO/GPO-1 e Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	45,16	81,55	42,42	83,17	0,2613	0,03	0,8676
PCR <i>M. bovigenitalium</i> e Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	34,48	74,74	29,41	78,89	0,0870	0,37	0,5419
PCR MGSO/GPO-1 e Isolamento <i>U. diversum</i>	34,25	79,10	64,10	52,48	0,1308	17,56	0,0000
PCR <i>U. diversum</i> e Isolamento <i>U. diversum</i>	71,88	50,77	58,97	64,71	0,2261	3,38	0,0660
PCR <i>M. bovigenitalium</i> e PCR MGSO/GPO-1	74,19	89,13	69,70	91,11	0,6200	0,06	0,8137

<sup>1</sup> Valor Preditivo Positivo

<sup>2</sup> Valor Preditivo Negativo

<sup>3</sup> Qui-Quadrado de McNemar

<sup>4</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

Tabela 7 - Estimativas de risco observadas (Odds Ratio) de acordo com a positividade para os diferentes microrganismos estudados, em muco prepucial bovino, segundo a técnica de detecção para os diferentes grupos, determinados pela idade dos animais e o manejo reprodutivo utilizado. São Paulo, 1998 - 2002

Variáveis	Técnica utilizada	n + <sup>1</sup>	n - <sup>2</sup>	OD <sup>3</sup>	CI 95% <sup>4</sup>	p <sup>5</sup>
Animais com menos de quatro anos	Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	6	10	2,10	0,63 - 6,96	0,36
	Isolamento <i>U. diversum</i>	11	5	3,20	0,97 - 10,50	0,09
	PCR MGSO/GPO-1	7	7	1,41	0,43 - 4,59	0,79
	PCR <i>M. bovigenitalium</i>	4	11	1,39	0,37 - 5,21	0,89
	PCR <i>U. diversum</i>	13	2	7,54	1,55 - 36,69	0,01
Animais com mais de quatro anos	Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	12	42	0,48	0,14 - 1,58	0,37
	Isolamento <i>U. diversum</i>	22	32	0,31	0,09 - 1,03	0,09
	PCR MGSO/GPO-1	22	31	0,71	0,22 - 2,31	0,78
	PCR <i>M. bovigenitalium</i>	11	42	0,72	0,19 - 2,70	0,89
	PCR <i>U. diversum</i>	25	29	0,13	0,02 - 0,64	0,01
Animais que passam por lavagem prepucial	Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	18	52	0,25	0,13 - 0,48	0,0001
	Isolamento <i>U. diversum</i>	33	37	0,23	0,12 - 0,45	0,0001
	PCR MGSO/GPO-1	29	38	0,23	0,12 - 0,45	0,0001
	PCR <i>M. bovigenitalium</i>	15	53	0,22	0,11 - 0,44	0,0001
	PCR <i>U. diversum</i>	38	31	0,22	0,10 - 0,44	0,0001
Animais que entram em estação de monta natural	Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	61	44	4,01	2,07 - 7,76	0,0001
	Isolamento <i>U. diversum</i>	82	21	4,38	2,24 - 8,56	0,0001
	PCR MGSO/GPO-1	80	24	4,37	2,25 - 8,42	0,0001
	PCR <i>M. bovigenitalium</i>	57	44	4,58	2,28 - 9,17	0,0001
	PCR <i>U. diversum</i>	86	15	4,68	2,26 - 9,66	0,0001

<sup>1</sup> n<sup>o</sup> de animais positivos; <sup>2</sup> n<sup>o</sup> de animais negativos; <sup>3</sup> Odds Ratio; <sup>4</sup> Intervalo de confiança;

<sup>5</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

Tabela 8 - Estimativas de risco observadas (Odds Ratio) de acordo com a positividade para os diferentes microrganismos estudados, em sêmen bovino, segundo a técnica de detecção para os diferentes grupos, determinados pela idade dos animais e o manejo reprodutivo utilizado. São Paulo, 1998 - 2002

Variáveis	Técnica utilizada	n + <sup>1</sup>	n - <sup>2</sup>	OR <sup>3</sup>	CI 95% <sup>4</sup>	p <sup>5</sup>
Animais com menos de quatro anos	Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	3	12	1,25	0,28 - 5,47	0,77
	Isolamento <i>U. diversum</i>	11	5	3,2	0,97 - 10,5	0,09
	PCR MGSO/GPO-1	1	12	0,67	0,07 - 6,28	0,72
	PCR <i>M. bovis genitalium</i>	0	13	0,92	0,03 - 24,15	0,55
	PCR <i>U. diversum</i>	13	2	7,54	1,55 - 36,69	0,01
Animais com mais de quatro anos	Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	8	40	0,83	0,25 - 2,75	0,77
	Isolamento <i>U. diversum</i>	22	32	0,31	0,09 - 1,03	0,09
	PCR MGSO/GPO-1	5	40	1,5	0,16 - 14,12	0,72
	PCR <i>M. bovis genitalium</i>	1	37	1,08	0,04 - 28,17	0,55
	PCR <i>U. diversum</i>	25	29	0,13	0,03 - 0,64	0,01
Animais que passam por lavagem prepucial	Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	11	52	0,58	0,26 - 1,32	0,27
	Isolamento <i>U. diversum</i>	22	41	0,29	0,14	0,0007
	PCR MGSO/GPO-1	6	55	0,19	0,07 - 0,52	0,001
	PCR <i>M. bovis genitalium</i>	2	48	0,05	0,01 - 0,24	0,0001
	PCR <i>U. diversum</i>	14	38	0,11	0,05 - 0,25	0,0001
Animais que entram em estação de monta natural	Isolamento <i>Mycoplasma</i> spp	21	58	1,71	0,75 - 3,89	0,27
	Isolamento <i>U. diversum</i>	52	28	3,46	1,73 - 6,92	0,0007
	PCR MGSO/GPO-1	27	49	5,05	1,92 - 13,26	0,001
	PCR <i>M. bovis genitalium</i>	32	42	18,29	4,13 - 80,95	0,0001
	PCR <i>U. diversum</i>	59	18	8,89	3,96 - 19,98	0,0001

<sup>1</sup> n° de animais positivos; <sup>2</sup> n° de animais negativos; <sup>3</sup> Odds Ratio; <sup>4</sup> Intervalo de confiança;

<sup>5</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

Tabela 9 - Médias das freqüências de touros à campo, que apresentaram a qualidade seminal inferior, igual ou superior aos parâmetros normais\*, segundo o momento do exame, o tipo de tratamento e o tipo de parâmetro analisado. São Paulo, 1999 – 2002

Parâmetros	Pré - tratamento		$p^3$	Pós - tratamento		$p$
	$\bar{x}^1$	$\bar{x}^2$		$\bar{x}^1$	$\bar{x}^2$	
Vigor	9,15	5,70	0,165	7,28	7,90	0,797
Motilidade	8,85	6,30	0,310	8,50	5,70	0,240
Concentração	5,95	10,50	0,077	3,80	4,50	0,857
Defeitos Maiores	6,39	8,38	0,414	7,17	8,10	0,699
Defeitos Menores	7,22	6,50	0,825	6,11	10,00	0,112
Defeitos Totais	-- <sup>4</sup>	--	--	5,56	11,00	0,019

<sup>1</sup> Média das freqüências de animais tratados com oxitetraciclina

<sup>2</sup> Média das freqüências de animais tratados com tiamulin

<sup>3</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

<sup>4</sup> o grupo de animais já apresentava variação significante antes do tratamento

\* COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, 1998.



Tabela 10 - Médias das freqüências de touros à campo, tratados com oxitetraciclina ou tiamulin, que apresentaram a qualidade seminal inferior, igual ou superior aos parâmetros normais\*, segundo o tipo de antibiótico e o tipo de parâmetro analisado. São Paulo, 1999 – 2002

Parâmetros	Oxitetraciclina		$p^3$	Tiamulin		$p$
	$\bar{X}^-$ <sup>1</sup>	$\bar{X}^+$ <sup>2</sup>		$\bar{X}^-$	$\bar{X}^+$	
Vigor	3,50	7,00	0,233	1,50	2,25	0,414
Motilidade	7,00	3,50	0,227	0,00	2,00	0,102
Concentração	3,25	2,00	0,138	1,00	0,00	0,317
Defeitos Maiores	2,50	5,00	0,498	2,00	2,00	0,593
Defeitos Menores	4,00	5,00	0,776	0,00	2,00	0,102
Defeitos Totais	4,50	4,50	1,000	0,00	2,00	0,109

<sup>1</sup> Média das freqüências de animais com parâmetro seminal inferior ao normal

<sup>2</sup> Média das freqüências de animais com parâmetro seminal igual ou superior ao normal

<sup>3</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

\* COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998.

Tabela 11 - Médias das freqüências de touros de Central de Inseminação, que apresentaram a qualidade seminal inferior, igual ou superior aos parâmetros normais\*, segundo o momento do exame, o tipo de tratamento e o tipo de parâmetro analisado. São Paulo, 1999 – 2002

Parâmetros	Pré - tratamento		$p^3$	Pós - tratamento		$p$
	$\bar{X}^1$	$\bar{X}^2$		$\bar{X}^a$	$\bar{X}^b$	
Vigor	15,32	16,82	0,653	12,50	16,81	0,170
Motilidade	14,26	18,11	0,246	14,27	14,77	0,892
Concentração	15,38	14,54	0,812	9,15	10,94	0,497
Defeitos Maiores	17,15	14,61	0,444	11,68	13,65	0,508
Defeitos Menores	17,53	13,18	0,179	13,57	11,00	0,403
Defeitos Totais	17,56	14,11	0,297	11,82	13,45	0,585

<sup>1</sup> Média das freqüências de animais tratados com oxitetraciclina

<sup>2</sup> Média das freqüências de animais tratados com tiamulin

<sup>3</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

\* COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, 1998.

Tabela 12 - Médias das freqüências de touros de Central de Inseminação, tratados com oxitetraciclina ou tiamulin, que apresentaram a qualidade seminal inferior, igual ou superior aos parâmetros normais\*, segundo o tipo de antibiótico e o tipo de parâmetro analisado. São Paulo, 1999 – 2002

Parâmetros	Oxitetraciclina		$p^3$	Tiamulin		$p$
	$\bar{X}^-$ <sup>1</sup>	$\bar{X}^+$ <sup>2</sup>		$\bar{X}^-$	$\bar{X}^+$	
Vigor	5,13	7,00	0,145	8,00	6,25	0,078
Motilidade	7,33	4,00	0,033	7,05	9,17	0,115
Concentração	3,00	5,00	0,093	4,00	5,29	0,086
Defeitos Maiores	5,75	5,33	0,646	7,40	7,75	0,177
Defeitos Menores	7,83	4,50	0,683	6,90	5,25	0,894
Defeitos Totais	5,75	5,33	0,646	7,30	8,00	0,198

<sup>1</sup> Média das freqüências de animais com parâmetro seminal inferior ao normal

<sup>2</sup> Média das freqüências de animais com parâmetro seminal igual ou superior ao normal

<sup>3</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

\* COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, 1998.

Tabela 14 - Odds ratio das médias das freqüências de touros que apresentaram sêmen contaminado por *Mycoplasma* spp e com qualidade seminal inferior aos parâmetros normais\*, segundo o tipo de parâmetro analisado e o momento do exame. São Paulo, 1999 - 2002.

Parâmetros	Pré-tratamento			Pós-tratamento		
	OR <sup>1</sup>	CI 95% <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	OR	CI 95%	p
Vigor	4,909	0,4024 - 59,886	0,2317	7,091	0,6622 - 75,931	0,1069
Motilidade	4,909	0,4024 - 59,886	0,2317	0,9583	0,1529 - 6,008	1,0000
Concentração	0,5400	0,1200 - 2,431	0,4927	1,200	0,2412 - 5,969	1,0000
Defeitos Maiores	0,2698	0,1295 - 5,621	0,5390	0,6092	0,02327 - 15,946	1,0000
Defeitos Menores	3,704	0,6902 - 19,874	0,1807	0,6092	0,02327 - 15,946	1,0000
Defeitos Totais	0,6944	0,06517 - 7,400	1,0000	0,6092	0,02327 - 15,946	1,0000

<sup>1</sup> Odds Ratio

<sup>2</sup> Intervalo de confiança

<sup>3</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

\* COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte, 1998.

Tabela 15 - Odds ratio das médias das freqüências de touros que apresentaram sêmen contaminado por *U. diversum* e com qualidade seminal inferior aos parâmetros normais\*, segundo o tipo de parâmetro analisado e o momento do exame. São Paulo, 1999 - 2002

Parâmetros	Pré-tratamento			Pós-tratamento		
	OR <sup>1</sup>	CI 95% <sup>2</sup>	p <sup>3</sup>	OR	CI 95%	p
Vigor	2,2222	0,1853 - 26,645	0,6060	2,213	0,1070 - 45,793	1,0000
Motilidade	2,2222	0,1853 - 26,645	0,6060	0,3333	0,04771 - 2,329	0,2677
Concentração	1,346	0,3597 - 5,037	0,7442	4,811	0,2479 - 93,395	0,3103
Defeitos Maiores	8,600	0,4154 - 178,06	0,1069	0,06280	0,002295 - 1,719	0,1707
Defeitos Menores	0,7500	0,1453 - 3,872	1,0000	0,06280	0,002295 - 1,719	0,1707
Defeitos Totais	0,6544	0,6517 - 7,400	1,0000	0,06280	0,002295 - 1,719	0,1707

<sup>1</sup> Odds Ratio

<sup>2</sup> Intervalo de confiança

<sup>3</sup> Probabilidade associada à hipótese de nulidade

\* COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, 1998.

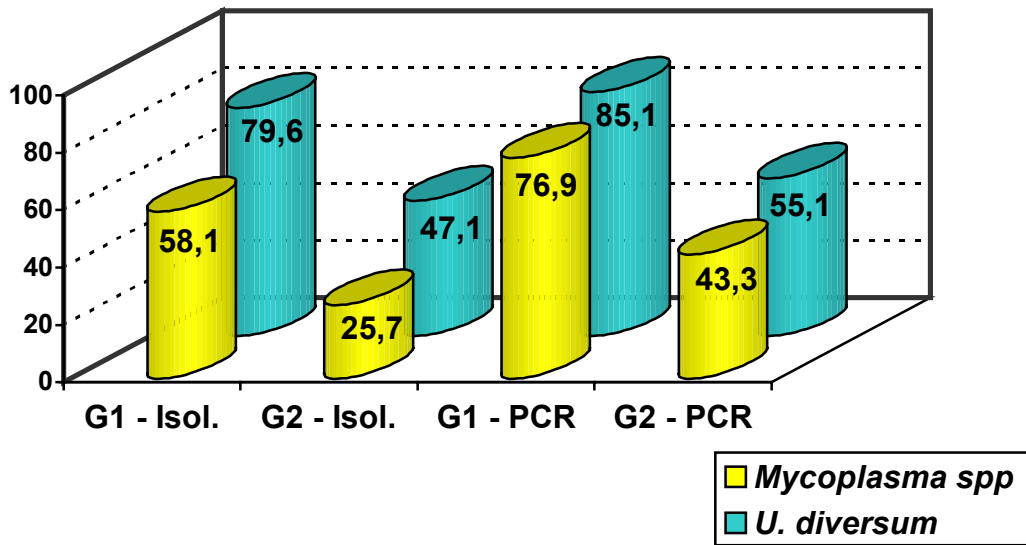


Gráfico 1 - Proporções de *Mycoplasma spp* e *U. diversum* detectados em amostras de muco prepucial bovino, segundo o grupo experimental e a técnica empregada. São Paulo, 1999 – 2002

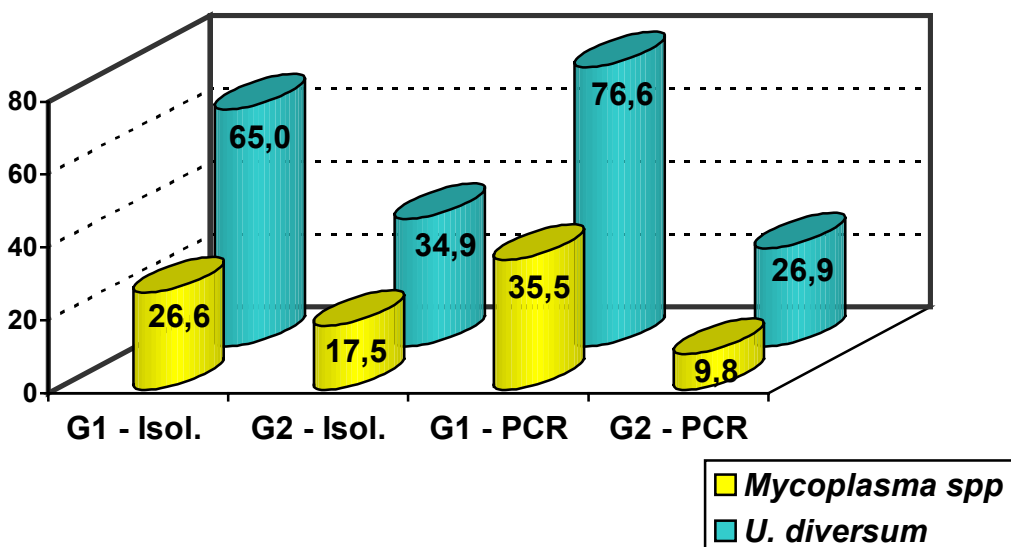


Gráfico 2 - Proporções de *Mycoplasma spp* e *U. diversum* detectados em amostras de sêmen bovino, segundo o grupo experimental e a técnica empregada. São Paulo, 1999 – 2002

## 6 DISCUSSÃO

---

A avaliação bacteriológica inicial dos materiais clínicos colhidos dos Grupos 1 e 2 revelou que ambos foram positivos para pelo menos um dos agentes investigados e, desta forma, não foi possível a adoção de controles negativos para o ensaio terapêutico.

Na detecção de *Mycoplasma* spp, as amostras de muco prepucial do Grupo 1 apresentaram 58,1% (61/105) de positividade pelo isolamento e 76,9% (80/104) pela PCR; no Grupo 2, as positivities foram 25,7% (18/70) ao isolamento e 43,3% (29/67) à PCR. Nas amostras de sêmen, as freqüências de *Mycoplasma* spp observadas foram 26,6% (21/79) ao isolamento e 35,5% (27/76) à PCR, para o Grupo 1; no grupo 2 as freqüências foram 17,5 (11/63) no isolamento e 9,8 (6/61) à PCR.

Em 1991, no Brasil, Terazaki et al., examinaram sêmen processado em centrais de inseminação e encontraram uma freqüência de 11% (11/110) de positivos para *Mycoplasma* spp, no entanto, Poumarat e Martel (1987) registraram freqüências de isolamento para *Mollicutes* variáveis, de 40 à 80% e para *U. diversum*, de 10 à 47% em sêmen bovino. No presente estudo houve menores taxas de isolamento para *Mollicutes* e maiores para *U. diversum*. Contudo, Ruhnke e Rosendal (1994) referiram uma freqüência variável de 23 a 84% de positividade para *U. diversum* em sêmen *in natura* contaminado, o que coincide com o presente trabalho. Sugeriram ainda, a importância do sêmen como veículo na transmissão de ureaplasmas. Resultado compatível foi encontrado por Fish et al., em 1985, que observaram 53,3% de *Mycoplasma* spp e 48,8% de *U. diversum* e por Hodges e

Holland (1980), que encontraram 76% de positividade para ureaplasmas em amostras de muco prepucial bovino.

A espécie *M. bovis genitalium* foi encontrada em 54,3% (57/105) das amostras de muco prepucial no Grupo 1 e 17,1% (12/70) no Grupo 2. Nas amostras de sêmen, a frequência encontrada foi de 39,5% (32/81) no Grupo 1 e 3,2% (2/63) no Grupo 2, confirmando os altos índices de infecção por tal agente. Dados similares foram relatados por Ball et al. (1987) que detectaram 48% de positivos para *M. bovis genitalium* e 72% de positivos para *Ureaplasma* em muco prepucial bovino enquanto que no sêmen, as taxas foram 20 e 32%, respectivamente.

As positivities encontradas pela PCR dizem respeito à utilização do sistema MGSP/GPO-1, que detecta *Mollicutes*. As taxas de detecção de *Mycoplasma* spp e *U. diversum*, pela PCR, foram menores (9,8 e 26,9%, respectivamente) que as encontradas ao isolamento (17,5 e 34,9%, respectivamente) nas amostras de sêmen colhidas nos animais do Grupo 2, contrariando o restante dos resultados, onde a PCR detectou maior número de positivos, como o esperado. O achado pode ser explicado pelo processo de extração do DNA cromossomal, que apesar de ter sido o mesmo utilizado com o restante das amostras processadas, pode ter sofrido influência de fatores inibidores. Como relatado por Guerin et al. (1995), Van Engelenburg et al. (1993) e Xia et al. (1995), componentes presentes no plasma seminal podem causar inibição à reação da PCR.

O *M. bovis* foi detectado pela PCR em apenas uma amostra de muco prepucial do Grupo 2, confirmando a baixa frequência deste agente no sistema genital bovino. Garcia et al. (1986), no Canadá, não encontraram *M. bovis* em 2950 amostras de sêmen *in natura*, Poumarat e Martel (1987), na França, referiram um índice de isolamento inferior a 3%. Kirkbride (1987), na Europa, América do Norte e



África do Sul menos de 5% de amostras de sêmen contaminadas pelo *M. bovis*.

Na análise comparativa dos valores discordantes entre técnicas de processamento de muco prepucial (McNemar), não houve diferença estatisticamente significativa, quando foram comparadas as técnicas: PCR por Sistema MGSO/GPO-1 e isolamento de *U. diversum* ( $p=0,5754$ ), além de PCR para *M. bovis* e isolamento para *Mycoplasma* spp ( $p=0,6397$ ). No entanto, houve significância ( $p\leq 0,05$ ) para os valores discordantes observados nos resultados dos testes efetuados em sêmen: PCR por Sistema MGSO/GPO-1 comparada ao isolamento de *Mycoplasma* spp e comparada à PCR para *M. bovis*; PCR para *M. bovis* comparada ao isolamento para *Mycoplasma* spp, além de PCR e isolamento para *U. diversum*. Observa-se portanto que, apesar da técnica de PCR ter apresentado maiores freqüências de detecção que os isolamentos, na maioria dos grupos estudados, os testes de sensibilidade, especificidade e Kappa, não indicaram a utilização única de uma técnica molecular para a detecção bacteriana. Nas associações, onde os resultados discordantes entre dois procedimentos ficaram dentro da margem do acaso, a substituição de uma técnica pela outra seria razoável.

A possibilidade de substituição da técnica de isolamento pelo Sistema MGSO/GPO-1 de PCR, foi encontrada para o diagnóstico inicial (triagem) de *U. diversum* em muco prepucial e, nas amostras de sêmen, para *Mycoplasma* spp. Apesar da comparação entre as técnicas ter apresentado esta possibilidade de substituição, novas investigações são indicadas com vistas à melhoria das características de sensibilidade e especificidade apresentadas. Para tal, seria recomendada uma alteração no par de *primers* ou a utilização de diferentes condições de estrigência (SAMBROOK et al., 1989).

Observou-se que no processamento de amostras de muco prepucial e sêmen, a PCR específica para *M. bovis genitalium* poderia substituir o isolamento, aprimorando sobremaneira o diagnóstico, já que a técnica de isolamento não é espécie-específica para esta bactéria, necessitando-se de uma prova sorológica para a tipagem bacteriana. Entretanto, seria pertinente que a técnica fosse submetida a algumas alterações de estringência para que a sensibilidade e a especificidade fossem melhoradas (SAMBROOK et al., 1989).

Em sêmen, foi constatado que a PCR espécie-específica, para *U. diversum*, teria pouca possibilidade de ser uma alternativa ao isolamento ( $p=0,066$ ). A prova apresentou uma especificidade mediana (50,77%) e o índice Kappa apresentou um grau de concordância razoável (0,2261). Cardoso et al. (2000), padronizaram a técnica de NESTED-PCR para o diagnóstico de Vulvovaginite Granular, selecionando os pares de *primers* UD, utilizados para detectar *U. diversum* em amostras de muco vaginal bovino. No referido trabalho, 52,9% das amostras testadas foram positivas resultando em 100% de sensibilidade, 73,1% de especificidade e 82,7% de eficiência para a técnica de PCR.

Persistindo na análise dos resultados dos exames de sêmen apresentados na tabela 6, constata-se que a PCR espécie-específica para *M. bovis genitalium* foi plenamente satisfatória ( $p=0,8137$ ) em relação ao Sistema MGSO/GPO-1 de PCR, ou seja, a frequência de valores discordantes observados esta dentro da margem atribuída ao acaso. A técnica mostrou uma sensibilidade razoável (74,19%), uma boa especificidade (89,13%) e o índice Kappa apresentou concordância substancial (0,62).

Os riscos de contaminação por *Mycoplasma* e *U. diversum* foram estimados segundo a faixa etária e o manejo reprodutivo. Analisando-se os grupos

experimentais por idade, observa-se que, para a contaminação de muco prepucial, os indivíduos com menos de quatro anos, foram mais susceptíveis à micoplasmas e ureaplasmas que aqueles maiores de quatro anos. A Odds Ratio (OD), mostrou que bovinos com menos de quatro anos tem de 3,2 à 7,54 vezes mais chance de serem portadores de *U. diversum* do que quando com mais de quatro anos. Para a contaminação por *Mycoplasma* spp, observou-se que animais com menos de quatro anos são 2,1 vezes mais susceptíveis a contaminação prepucial que animais mais velhos. Em sêmen, as mesmas taxas foram observadas para *U. diversum* em animais com menos de quatro anos, porém para *Mycoplasma* spp o risco de contaminação foi menor (1,25) que o encontrado em muco prepucial.

Um paralelo poderia ser traçado com a Campilobacteriose Genital Bovina, doença venérea clássica, cuja patogenidade é dependente das condições ambientais para o desenvolvimento dos agentes. Nesta patologia, os reprodutores jovens apresentam resistência à infecção, a qual declina com o passar do tempo. A explicação para o fenômeno, seria a profundidade das criptas da mucosa prepucial e peniana dos touros adultos, que favorecem o desenvolvimento dos microrganismos pela microaerofilia produzida (STOESSEL, 1982). Os valores encontrados no presente estudo, para *Mycoplasma* spp, *Mycoplasma bovigenitalium* e *U. diversum*, mostraram um comportamento diferenciado da Campilobacteriose Genital. Apesar de microaerófilos, os animais jovens foram classificados como mais susceptíveis que os mais velhos, no entanto, uma exceção foi observada contaminação seminal por *M. bovigenitalium* em sêmen que, apesar de pouco intensa (1,08), poderia justificar a maior atenção à esta espécie de *Mycoplasma* nas Centrais de Inseminação.

Os microrganismos dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* desencadeiam infecções urogenitais, e não somente genitais. A análise da distribuição etária dos

animais infectados indica que estes agentes não se beneficiam das alterações de prepúcio e pênis, como ocorre na Campilobacteriose Genital. Essa diferença poderia ser explicada pelo mecanismo de patogenicidade, pois o *Ureaplasma* necessita de uréia para a colonização e desenvolvimento no organismo hospedeiro e os micoplasmas genitais são favorecidos pelo tipo de epitélio existente nos tratos genital e urinário (CARDOSO, 1998).

Cardoso et al. (2000) observaram que fêmeas, da espécie bovina, com menos de 2,5 anos de idade são mais susceptíveis à *U. diversum* que animais mais velhos. As novilhas apresentaram menor freqüência (40%) que vacas (60%) na detecção de *U. diversum*, entretanto o risco relativo para novilhas foi de 1,68 enquanto que para vacas foi de 0,78. A maior freqüência em vacas foi justificada pelo maior tempo de exposição ao agente. Por outro lado, o maior risco relativo observado em novilhas foi justificado pela imaturidade do sistema imunológico. Esse achado pode ser comparado aos resultados obtidos no presente trabalho, onde touros jovens mostraram maior susceptibilidade à *Mycoplasma* e *U. diversum*.

O estudo da influência do tipo de manejo reprodutivo, confirmou a transmissão venérea das micoplasmoses, pois os animais que, à campo, entram em estação de monta, apresentaram OD variando de 4,01 até 4,68, em muco prepucial e de 1,71 até 18,29, em sêmen, para os diferentes agentes estudados, diagnosticados por diferentes técnicas quando comparados aos animais mantidos estabulados em recintos em centrais de inseminação artificial.

A análise comparativa da presença de *M. bovis genitalium* no sêmen de animais mantidos à campo e submetidos a monta natural, apresentou OD de 18,29, apesar da freqüência de detecção da espécie ter sido maior em muco que em sêmen (54,4% e 43,2%, respectivamente), mostrando a importância do agente na

transmissão venérea, em especial, através de sêmen contaminado.

Persistindo na análise da influência de diferentes procedimentos de manejo reprodutivo sobre a frequência das infecções, constata-se que animais que passam por lavagem prepucial na coleta de sêmen, ou seja, reprodutores de central de inseminação, apresentaram OD menor que um (1), quando analisados ambos os materiais clínicos, muco prepucial e sêmen, sendo estes dados considerados não significativos. Observa-se, através destes achados, que o processo de lavagem prepucial com solução salina pode diminuir o risco de contaminação no momento da coleta do sêmen, quando se compara este manejo à total falta de cuidados com a higiene, como na monta natural.

A obtenção de um sêmen estéril é virtualmente impossível (THIBIER; GUERIN, 2000), pois microrganismos diversos estão presentes em todos os ejaculados, assim sendo, uma estratégia de limpeza da cavidade prepucial pré-coleta comprovadamente diminui o número de microrganismos viáveis no sêmen.

A análise da eficiência do ensaio terapêutico realizado com os diferentes grupos de animais, empregou o teste de Wilcoxon, para análise intragrupos, onde foram analisados os dados referentes aos dois momentos, pré e pós-tratamento, sem se levar em consideração o antibiótico utilizado, mas somente o efeito de tratamento, e o teste de Mann-Whitney, para análise intergrupos, ou seja, o grupo dos animais tratados com Oxitetraciclina comparado ao grupo dos animais tratados com Tiamulin.

Nos Grupos 1 e 2, nos momentos pré e pós-tratamento, não foi observada alteração significativa ( $p \leq 0,05$ ) sobre os diferentes parâmetros seminais analisados e o parâmetro defeitos totais para o Grupo 1, não pode ser considerado pois já na fase pré-tratamento o grupo não foi homogêneo ao teste estatístico. Desta forma, a

significância do resultado observado para este parâmetro ( $p=0,019$ ) no momento pós-tratamento, não pode ser atribuída ao efeito do tratamento adotado.

A análise comparativa dos dois tipos de tratamentos adotados aplicada ao Grupo 1, animais mantidos à campo, não revelou alteração significativa sobre os parâmetros analisados, porém, para o Grupo 2, animais mantidos em central de inseminação, o tratamento com Oxitetraciclina determinou resultados significativos sobre a motilidade espermática ( $p=0,033$ ). Este dado corrobora a afirmação de que *Mycoplasma* e *U. diversum* prejudicam a motilidade seminal (DOIG, 1981b; EAGLASOME et al., 1992; FISH et al., 1985; HALL; MCENTEE, 1981; HUFFMAN et al., 1985; JASPER, 1987; KIRKBRIDE, 1987; RAE et al., 1995) e de fato a oxitetraciclina tem sido utilizada com sucesso no tratamento sistêmico em casos de micoplasmoses clínicas (LORTON et al., 1988; STIPKOVITS et al., 1984).

Durante as aplicações do antibiótico Tiamulin nos animais do Grupo 2, foram observadas reações indesejáveis, representadas por febre e inflamação local em todos os animais tratados, e esta condição inviabilizou a continuidade da prescrição. Desta forma, não foi possível a análise do efeito do tratamento com tiamulin neste grupo.

A análise da presença ou ausência de micoplasmas e ureaplasmas pelas diferentes técnicas empregadas, associadas ou não, em muco prepucial e pênis, revelou que no grupo de animais com muco prepucial positivo e sêmen negativo, as freqüências apresentaram uma queda razoável ou se mantiveram iguais, exceção só obtida nos dados referentes às freqüências de detecção de *Mycoplasma* spp através da técnica de PCR, onde foi observado um aumento da freqüência (38,09% para 59,68%). Pode-se observar que nos animais com sêmen positivo e muco prepucial positivo ou negativo, houve elevação nas freqüências de contaminação, pós-

tratamento tanto para a presença de *Mycoplasma* quanto para *U. diversum*. Analisando-se estes dados, observa-se que a terapia com antibióticos teve algum grau de atuação sobre a contaminação em muco prepucial, no entanto não foi eficaz sobre a frequência dos agentes no sêmen. Apesar de as duas drogas utilizadas apresentarem excreção renal, a capacidade de atuação das mesmas sobre a mucosa peniana e prepucial não é conhecida, o que poderia justificar os resultados observados neste estudo.

A Odds Ratio também foi utilizada para a análise da presença de *Mycoplasma* e *U. diversum* antes e após o tratamento com antibiótico, independentemente do tipo de antibiótico e associada à alterações nos parâmetros seminais estudados, não tendo sido observada alteração significativa associada ao tratamento sobre nenhum dos parâmetros analisados, contudo houve diminuição na estimativa de risco, após o tratamento, quando associada a presença de *Mycoplasma* à motilidade (4,90 para 0,95) e à defeitos menores (3,704 para 0,609), e a presença de *U. diversum* à motilidade (2,22 para 0,33) e à defeitos maiores (8,6 para 0,062). Por outro lado, houve intensificação na associação entre a presença de *Mycoplasma*, vigor (4,9 para 7,09) e concentração seminais (0,54 para 1,2). O mesmo foi observado na associação entre *U. diversum* e a concentração seminal (1,34 para 4, 81). Na associação entre *U. diversum* e o vigor espermático, OD manteve-se constante, mostrando que o tratamento não teve qualquer ação sobre este parâmetro.

Observa-se que, tanto na contaminação seminal por *Mycoplasma* como para *U. diversum*, as OD aumentaram para o vigor e concentração e diminuíram para a motilidade e os defeitos, apesar de não ter sido observada diminuição na frequência dos agentes em sêmen após a terapia antimicrobiana (tabela 13). Pode-se aferir que houve um efeito positivo desta terapia sobre os parâmetros motilidade e defeitos,

confirmando novamente, a atuação dos agentes sobre os mesmos (DOIG, 1981b; EAGLASOME et al., 1992; FISH et al., 1985; HALL; MCENTEE, 1981; HUFFMAN et al., 1985; JASPER, 1987; KIRKBRIDE, 1987; RAE et al., 1995).

Analisando-se conjuntamente os dados apresentados na tabela 13 e as tabelas 14 e 15, ou seja, as freqüências dos agentes observadas nos momentos pré e pós-tratamento e as OD para *Mycoplasma* spp e *U. diversum*, observa-se que o aumento das freqüências em sêmen resultaram em um aumento nas OD para os parâmetros vigor e concentração. Vale Filho et al. [1978?], referem que problemas com o vigor espermático podem estar relacionados à espermiogênese, problemas estes diretamente associados aos testículos e indiretamente aos sistemas endócrino e nervoso central. O mesmo é aferido para a concentração dos gametas que é muito reduzida nos casos graves, podendo atingir azoospermia. A baixa concentração pode estar associada à hipoplasia ou degeneração testicular, orquite, imaturidade sexual e criptorquidia bilateral.

Os resultados obtidos no presente estudo não permitiram a caracterização dos fatores responsáveis por baixo vigor e concentração espermática, dado que os touros não foram acompanhados clinicamente durante o trabalho, porém, os achados coincidem com o referido por Eaglesome et al. (1992), Panangala et al. (1981) e Pilaszek; Truscynski (1988), onde são apresentadas informações sobre a atuação de *Mycoplasma* spp e *U. diversum* sobre o sistema reprodutor, especialmente sobre os testículos, resultando em orquite, e epidídimo, causando epididimite, patologias estas responsáveis pelas alterações espermáticas observadas.



## 7 CONCLUSÕES

---

- A. Os agentes *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* foram encontrados nas quatro propriedades rurais e na central de inseminação.
- B. O Sistema MGSO/GPO-1 de PCR, pode ser indicado como teste de triagem para o diagnóstico de *Mycoplasma* spp em sêmen e de *U. diversum* em muco prepucial.
- C. Os valores discordantes entre a técnica clássica de isolamento bacteriano e as PCR espécie-específicas aplicadas ao diagnóstico de *M. bovigenitalium* em muco prepucial e sêmen, e de *U. diversum* em sêmen, ficaram situados na faixa atribuída ao acaso.
- D. Animais com menos de quatro anos de idade apresentaram maiores taxas de contaminação por *Mycoplasma* spp, *M. bovigenitalium* e *U. diversum* em muco prepucial e sêmen, que animais com mais de quatro anos.
- E. Animais criados a campo apresentaram maiores taxas de contaminação por *Mycoplasma* spp, *M. bovigenitalium* e *U. diversum* em muco prepucial e sêmen, que animais de central de inseminação.

- F. O tratamento com oxitetraciclina, na dosagem única de 20 mg/kg PV (IM), ou tiamulin, na dosagem de 15 mg/kg PV (IM), em três aplicações sucessivas, com intervalos de 24 horas, não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre os parâmetros de qualidade seminal (vigor, motilidade, concentração e defeitos espermáticos) no grupo de animais mantidos à campo.
- G. O tratamento com a oxitetraciclina, na dosagem única de 20 mg/kg PV (IM), provocou aumento da motilidade espermática no grupo de animais em central de inseminação.
- H. A terapia com oxitetraciclina, na dosagem única de 20 mg/kg PV (IM), ou tiamulin, na dosagem de 15 mg/kg PV (IM), em três aplicações sucessivas, com intervalos de 24 horas, apresentou efeito positivo sobre a motilidade espermática e as taxa de defeitos menores, quando associados à presença de *Mycoplasma* spp, e defeitos maiores quando associados à presença de *U. diversum* .

## REFERÊNCIAS\*

---

- AFSHAR, A.; EAGLESOME, M. D. Viruses associated with bovine semen. **The Veterinary Bulletin**, v. 60, p. 689-697, 1990.
- AHMAD, K.; FOOTE, R. H.; KAPROTH, M. Post-thaw motility, acrossomal integrity and fertility of antibiotic-treated frozen bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 27, p. 923-930, 1987.
- ALBERTSEN, B. E. Pleuropneumonia-Like organisms in the semen of Danish artificial insemination bulls. **Nordish Veterinaermedicin**, v. 7, p. 169-201, 1955.
- ALLAN, E. M.; PIRIE, H. M. *In vitro* activity of tiamulin against bovine respiratory tract mycoplasmas. **Research in Veterinary Science**, v. 31, p. 174-176, 1981.
- ANDRADE, L. E. C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 39, p. 175-86, 1993.
- AYLING, R. D.; BAKER, S. E.; PEEK, M. L.; SIMON, A. J.; NICHOLAS, R. A. J. Comparison of *in vitro* activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. **Veterinary Record**, v. 146, p. 745-747, 2000.
- BALL, H. J.; LOGAN, E. F.; ORR, W. Isolation of mycoplasma from bovine semen in Northern Ireland. **Veterinary Record**, v. 121, p. 322-324, 1987.
- BARBEYRAC, B.; BÉRBÉAR, C.; TAYLOR-ROBINSON, D. PCR: Preparation of DNA from clinical specimens. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1996. v. 2, p. 61-64.
- BERGEY, D. H.; HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; BERGY, D. **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787 p.
- BIELANSKI, A.; DUBUC, C. *In vitro* fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). **Theriogenology**, v. 41, p. 1211-1217, 1994.
- BRITTON, A. P.; MILLER, R. B.; RUHNKE, H. L.; JOHNSON, W. H. The recovery of Ureaplasmas from bovine embryos following *In vitro* exposure and ten washes. **Theriogenology**, v. 30, p. 997-1003, 1988.

---

\* De acordo com NBR-6023/2002

CARDOSO, M. V.; GRASSO, L.; STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; CUNHA, R. A. F. Isolamento de *Ureaplasma diversum* e *Mycoplasma* spp em casos de Vulvite Granular Bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 172-173, 1997.

CARDOSO, M. V. ***Ureaplasma diversum* e vulvovaginite granular bovina (VVG), uma provável associação. Diagnóstico através de técnicas de cultivo e reação da polimerase em cadeia.** 1998. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

CARDOSO, M. V.; BLANCHARD, A.; FERRIS, S.; VERLENGIA, R.; TIMENETSKY, J.; CUNHA, R. A. F. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 241-250, 2000.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

CUNHA, R. A. F.; TAKIMOTO, S.; TAKEI, K. Modificação e padronização de meios de transporte e cultivo de Mycoplasmas genitais: *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 23, p. 170-177, 1987.

DOIG, P. A. Bovine Genital Mycoplasmosis. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 22, p. 339-343, 1981a.

DOIG, P. A.; MACKAY, A. L.; RUHNKE, H. L. Ureaplasma (T strain mycoplasma) infection in the bovine reproductive tract. **American Association of Bovine Practitioners Proceedings**, v. 13, p. 127-136, 1981b.

DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L. Effects of Ureaplasma infection on bovine reproduction. In: MORROW, D. A. (Ed.). **Current therapy in theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Diseases in Small and Large Animals.** Philadelphia: W. B. Saunders, 1986, p. 282-187.

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; treatment of bull semen with antimicrobial agents. **The Veterinary Bulletin**, v. 62, p. 887-910, 1992.

EAGLESOME, M. D.; BIELANKI, A.; HARE, W. C. D.; RUHNKE, H. L. Studies on inactivation of pathogenic microorganisms in culture media and in bovine semen by photosensitive agents. **Veterinary Microbiology**, v. 38, p. 277-284, 1994.

EICHWALD, C.; ILLNER, F.; TROLLDENIER, H. (Ed.). **Micoplasmosis de los animales.** Zaragoza: Editorial Acribia, 1973. 291 p.

EUCLIDES FILHO, K. **Produção de bovino de corte e o trinômio genótipo-ambiente-mercado**. Disponível em:

<<http://www.cnpge.embrapa.br/publicacoes/doc.doc85>>. Acesso em: 14 maio 2003.

FARAH, S. B. **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997. 276 p.

FISH, N. A.; ROSENDAL, S.; MILLER, R. B. The distribution of Mycoplasmas and Ureaplasmas in the genital tract of normal artificial insemination bulls. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 26, p. 13-15, 1985.

FLATSCHER, J.; HOLMANN, A. Genital diseases in bulls: importance for artificial insemination - control measures. In: CONFERENCE OF THE REGIONAL COMMISSION FOR EUROPE, 11., 1981, Vienna. **Proceedings...** Vienna: Office International des Épizooties, 1981, p. 393-403.

FRIBERG, J. Mycoplasmas and ureaplasmas in infertility and abortion. **Fertility and Sterility**, v. 22, n. 4, p. 351-359, 1980.

GALEN, R. S.; GAMBINO, S. R. **Beyond normality**: the predictive value efficiency of medical diagnosis. New York: John Wiley e Sons, 1975. 237 p.

GARCIA, M. M.; TRUSCOT, R. B.; MCLAREN, J.; STEWART, R. B.; KINGSCOTE, B.; BURCHAK, J. Absence of *Mycoplasma bovis* in unprocessed frozen bull semen' from Canadian artificial insemination centres. **The Veterinary Record**, v. 119, p. 11-12, 1986.

GHADERSOHI, A.; COELEN, R. J.; HIRST, R. G. Development of specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 87-98, 1997.

GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S. Campilobacteriose genital: proposta de diagnóstico mais sensível em touros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 56, p. 5-7, 1989.

GOURLAY, R. N. Significance of Mycoplasma infection in cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 163, n. 7, p. 905 - 909, 1973.

GUERIN, C.; ALLIETTA, M.; GUERIN, B.; THIBIER, M. Detection of pseudorabies virus in semen of boar by a polymerase chain reaction. **Veterinary Research**, v. 26, n. 2, p. 140-144, 1995.

HALL, C. E.; MCENTEE, K. Reduced post-thawing survival of sperm in bull with Mycoplasmal vesiculitis (Brief Communication). **The Cornell Veterinarian**, v. 71, p. 111-2, 1981.

HIRTH, R. S.; NIELSEN, S. W.; PLASTRIDGE, W. N. Bovine salpingo-oophoritis produced with semen containing a mycoplasma. **Pathologia Veterinaria**, v. 3, p. 616-632, 1966.

HODGES, R. T.; HOLLAND, J. T. S. The recovery of ureaplasmas from the semen and prepuce of bulls. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 28, p. 89-90, 1980.

HOLZMANN, A.; LABER, G.; GUMHOLD, G. Tiamulin, a new antibiotic for eliminating mycoplasmas from bovine semen 1. Investigations on spermatozoal toxicity. **Theriogenology**, v. 22, n. 3, 1984.

HOWARD, C. J.; GOURLAY, R. N.; BROWNLIE, J. The virulence of T-mycoplasma isolated from various animal species, assayed by intramammary inoculation in cattle. **The Journal of Hygiene**, v. 71, p. 163-170, 1973.

HOWARD, C. J. Animal ureaplasmas: their ecological niche and role in disease. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 20, p. 954-957, 1984.

HUFFMAN, E. M.; CHRISTENSEN, V.; HIRD, D.; JASPER, D. Epidemiology of bovine genital ureaplasma infection. **Proceedings of the Society of Theriogenology**, p. 67-71, 1985.

JASPER, D. E. Bovine mastitis due to mycoplasma. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 6, p. 801-807, 1987.

JURMANOVA, K.; STERBOVA, J. Correlation between impaired spermatozoan motility and mycoplasma finding in bull semen. **The Veterinary Record**, v. 100, p. 157-158, 1977.

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

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

KOBAYASHI, H.; HOROSE, K.; WORARACH, A.; PAUGTES, P.; ITO, N.; MOROZUMI, T.; YAMAMOTO, K. *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovirhinis* by PCR. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 60, n. 12, p. 1299-1303, Dec., 1997.

KUPPEVELD, F. J. M.; LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; ZOEST, M. J.; QUINT, W. G. V.; NIESTERS, H. G. M.; GALAMA, J. M. D.; MELCHERS, W. J. G. Genus- and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16 rRNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2606-2615, 1992.

LE GRAND, D.; POUMARAT, F.; MARTEL, J. L. Infectious genital disease by *Ureaplasma diversum*, investigations on bovine in France. **Veterinary Research**, v. 26, n. 1, p. 11-20, 1995.

LIBERAL, M. H. T.; ROMINJN, P. C.; VOLLU, E. W. Presença de *Mycoplasma* spp. em pulmão de bezerro de até um ano de idade. **Comunicado Técnico**. Rio de Janeiro: PESAGRO, 1982. v. 08, n. 1/3.

LINGWOOD, C.A.; QUINN, P.A.; WILANSKY, S. Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 694-697, 1990.

LORTON, S. P.; SULLIVAN, J. J.; BEAN, B.; KAPROTH, M.; KELLGREN, H.; MARSHALL, C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen, 3. evaluation of fertility. **Theriogenology**, v. 29, n. 3, p. 609-614, 1988.

MACLURE, M.; WILLET, W. C. Misinterpretation and misuse of Kappa statistic. **American Journal of Epidemiology**, v. 126, p. 161, 1987.

MILLER, R.B.; RUHNKE, H.L.; DOIG, P.A.; POITRAS, B.J.; PALMER, N.C. The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows. **Theriogenology**, v. 20, p. 367-373, 1983.

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

MOREIRA, E. C. **Importância do controle da sanidade animal sobre produtos de origem animal**. Disponível em: <[http://www.saudeanimal.org.br/trab\\_cientifico/sincorte/sincorte.pdf](http://www.saudeanimal.org.br/trab_cientifico/sincorte/sincorte.pdf)>. Acesso em: 14 maio 2003.

NASCIMENTO, E. R.; D'ANGELIS, F. H. F.; NASCIMENTO, M. G. F.; RESENDE, O. A. Isolamento de micoplasmas de touros provenientes de um rebanho com problemas reprodutivos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 158-160, 1998.

NICOLET, J. **Compendio de bacteriologia veterinária**. Zaragoza: Acribia, 1986. 275 p.

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

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

PANANGALA, V.S.; WINTER, A.J.; WIJESINHA, A.; FOOTE, R. H. Decreased motility of bull spermatozoa caused by *Mycoplasma bovis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 12, p. 2090-2093, 1981.

PAREZ, M. The most important genital diseases of cattle (control, treatment and the hygiene of semen collection). **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 4, n. 1, p. 69-87, 1985.

PATHAK, R. C.; GARG, D. N. Immunology of bovine genital mycoplasmosis. **Progress in Veterinary Microbiology and Immunology**, v. 4, p. 218-245, 1988.

PICARD, L.; SAUVAGEAU, R.; LAMOTHE, P. Influence de la tylosine soluble sur l'endomètre de la vache **The Canadian Veterinary Journal**, v. 25, p. 300-301, 1984.

PILAZEC, J.; TRUSZCZYNSKI, M. Affinity of microorganisms of the genus *Ureaplasma* to the reproductive organs of cattle. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 11, p. 177-180, 1988.

POUMARAT, F.; MARTEL, J. L. Mycoplasmoses bovines. **Revue de medecine veterinaire**, v. 138, n. 10, p. 799-806, 1987.

POUMARAT, F.; LE GRAND, D.; BERGONIER, D. Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. **Le Point Veterinaire**, v. 28, p. 13-20, 1997.

QUINN, P. A.; SHEWCHUK, A. B.; SHUBER, J.; KIE, K. I.; RYAN, E.; SHEU, M.; CHIPMAN, M. L. Serologic evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in women with spontaneous pregnancy loss. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 145, p. 245-250, 1983.

RAE, D. O.; CHENOWETH, P. J.; BROWN, M. B. *Ureaplasma* infection in the bovine. **Archives of STD / HIV Research**, v. 7, p. 239-243, 1995.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. Biochemical and enzymatic test in Mycoplasma identification. In: **Methods in mycoplasmaology**. New York: S. Razin e J. G. Tully, Ed., 1983, v. 1, p. 335-389.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: GELVIN, B.; SCHILPERROOT, R. A. (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Belgium: Kluwer Academic Publishers, 1994. v. D1, p. 1-8.

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

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

RUHNKE, H. L. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. (Ed.). **Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis**. Ames: Iowa State University Press, 1994. p. 56-62.

RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C.; DOIG, P.A.; MILLER, R.B. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*. **Theriogenology**, v. 21, p. 295-301, 1984.



RUHNKE, H. L.; ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. (Ed.). **Mycoplasmosis in Animals: laboratory diagnosis**, Iowa: Iowa State University Press, AMES, 1994. p. 141-155.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 957 p.

SHIN, S.; LEIN, D. H.; PATTEN, V. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus*, *Haemophilus somnus*. **Theriogenology**, v. 29, p. 577-591, 1988.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica (para as ciências do comportamento)**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350 p.

SILVA, N. **Detecção de patógenos no sêmen. Detecção de agentes patogênicos em sêmen bovino destinado a inseminação artificial**. Disponível em: <[http://www.biotecnologia.com.br/bio06/6\\_i.html](http://www.biotecnologia.com.br/bio06/6_i.html)>. Acesso em: 14 maio 2003.

SIMECKA, J. W.; DAVIS, J. K.; DAVIDSON, M. K.; ROSS, S. E.; STADTLANDER, C. T.; CASSELL, G. M. Mycoplasma diseases of animals. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R.; FINCH, L.; BASEMAN, J. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 391-415.

SMITH, R. D. **Veterinary clinical epidemiology. A problem-oriented approach**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1990. 279 p.

SPERGSER, J.; AURICH, C.; AURICH, J. E.; ROSENGARTEN, R. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p. 119-129, 2002.

STIPKOVITS, L.; VARGA, Z.; LABER, G.; BÖCKMANN, J. A comparison of the effect of tiamulin hydrogen fumarate and tylosin tartrate on mycoplasmas of ruminants and some animal ureaplasmas. **Veterinary Microbiology**, v. 9, p. 147-153, 1984.

STIPKOVITS, L.; RIPLEY, P. H.; VARGA, J.; PALFI, V. Use of valnemulin in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions. **Veterinary Record**, v. 148, p. 399-402, 2001.

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

STOESSEL, F. **Las enfermedades venereas de los bovinos: trichomoniasis y vibriosis genital**. Zaragoza: Acibia, 1982. p. 77-78.

SUBRAMANIAN, S.; BERGONIER, D.; POUMARAT, F.; CAPAUL, S.; SCHLATTER, Y.; NICOLET, J.; FREY, J. Specie identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* gene by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 12, p. 161-169, 1998.

TAYLOR-ROBINSON, D.; THOMAS, M.; DAWSON, P. L. The isolation of T-mycoplasmas from the urogenital tract of bulls. **Journal of Medical Microbiology**, v. 2, p. 527-533, 1969.

TAYLOR-ROBINSON, D.; MCCORMACK, W. M. The genital mycoplasmas. **The New England journal of medicine**, v. 302, p. 1003-1010, 1063-1067, 1980.

TERAZAKI, M. H. F.; CAMPOS, S. G.; LIBERAL, M. H. T.; YIDA, O.; ROSSINI, A. J. Micoplasmose bovina: isolamento em sêmen diluído e tratado com antimicrobianos inespecíficos. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 14, n. 2, p. 147-152, 1991.

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

THORNER, P. M. *Ureaplasma* association with bovine infertility in south-west Scotland. **Veterinary Record**, v. 18, n. 111, p. 519, Dec. 1982. Letters.

TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. The Genera *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: TIMONEY, J. F.; GILLESPIE, J. H.; SCOTT, F. W.; BARLOUGH, J. E. **Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. London: Comstock Publishing Associates, 1998. p. 295-317.

TRICHARD, C. J. V. e JACOBSZ, E. P. Mycoplasmas recovered from bovine genitalia, aborted fetuses and placenta in the Republic of South Africa. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 105-110, 1985.

TRUSCOTT, R. B.; ONOVIRAM, O.; RUHNKE, H. L.; FISH, N. A.; BARKER, C. A. *In vitro* antimicrobial sensitivity of Mycoplasmas isolated from the bovine genital tract. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 39, p. 417-420, 1975.

TRUSCOTT, R. B.; RUHNKE, H. L. The effect of antibiotics against bovine mycoplasmas and ureaplasmas. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, p. 171-174, 1984.

TULLY, J. G.; BOVÉ, J. M.; LAIGRET, F.; WHITCOMB, R. F. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmatales* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*, and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 378-385, 1993.

VALE FILHO, V. R.; PINTO, P. A.; FONSECA, J.; SOARES, L. C. O. V. **Patologia do sêmen: diagnóstico andrológico e classificação do *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto à fertilidade para uso como reprodutor em condições de Brasil - de um estudo em 1088 touros**. [S.l.: s.n.], [1978?]. 54 p.

VAN ENGELENBURG, F. A.; MAES, R. K.; VAN OIRSCHOT, J. T.; RIJSEWIJK, F. A. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 3129-3135, 1993.

VISSER, I. J. R.; LAAK, E. A.; JANSEN, H. B.; GERARD, O. The effect of two antibiotic mixtures on *Haemophilus somnus*, *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*, *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* in frozen bovine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 30, p. 55-59, 1995.

XIA, J. Q.; YASON, C. V.; KIBENGE, F. S. Comparison of Dot Blot hybridization polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 2, p. 102-109, 1995.