

HUBER RIZZO

Avaliação clínica e estudo da ocorrência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade – SP – “Avaliação da infecção sobre a produtividade do rebanho”

HUBER RIZZO

Avaliação clínica e estudo da ocorrência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade – SP – “Avaliação da infecção sobre a produtividade do rebanho”

Dissertação apresentada do Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Profa. Dra. Lílian Gregory

São Paulo

2006

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.1623
FMVZ

Rizzo, Huber

Avaliação clínica e estudo da ocorrência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade – SP – “Avaliação da infecção sobre a produtividade do rebanho” / Huber Rizzo. – São Paulo : H. Rizzo, 2006.
111 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2006.

Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Gregory.

1. Micoplasmose animal. 2. Micoplasmas. 3. Ovinos. 4. Ureaplasma. 5. Vulvovaginite animal. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

P A R E C E R

Interessado: Huber Rizzo

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 688/2005, intitulado: "Avaliação clínica e estudo da prevalência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade - SP - Avaliação da infecção sobre a produtividade do rebanho", utilizando 60 fêmeas ovinas, sob responsabilidade da Profa. Dra. Lilian Gregory, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 26 de setembro de 2005


Prof. Dra. Julia Maria Matêra

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Rizzo, Huber

Título: Avaliação clínica e estudo da ocorrência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade – SP – “Avaliação da infecção sobre a produtividade do rebanho”

Dissertação apresentada do Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico esse trabalho à minha família com muito amor e gratidão

Aos meus pais, Durval e Neusa

A minha avó Carmen

Minhas irmãs Simone e Sandra

Meus cunhados Luiz Carlos e Wanderley

Que seja um exemplo para meus queridos sobrinhos, Vitor, Gustavo, Nataty,

Leonardo e Matheus

Agradeço a Deus por estar sempre comigo durante essa caminhada

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof.a. Dra. Lilian Gregory pela amizade, confiança, incentivo, oportunidades de aprendizado e crescimento em minha profissão.

Ao Professores Dr. Antônio Fernandes Filho, Dr. José Luiz D'Angelino e Dr. Raul Gastão Mucciolo com quem iniciei meus primeiros trabalhos durante a graduação na Universidade de Santo Amaro.

Aos Professores Antonio Carlos Bolino e Elizabeth Bohland e o funcionário Osmar Souza pelos ensinamentos durante minha residência no Hospital da Universidade de Santo Amaro.

Aos Professores Dr. Fernando José Benesi, Dr. Wilson Roberto Fernandes, Dr. Wanderley Pereira de Araújo, Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, Dr. Enrico Lippi Ortolani, Dra. Alice Della Libera pelos ensinamentos em semiologia e clínica médica durante o período de mestrado, principalmente durante as atividades do programa de aperfeiçoamento de ensino das respectivas disciplinas.

Dra Maria do Carmo Custódio S. H. Lara e Dra. Maristela Vasconcellos Cardoso pelos ensinamentos e apoio durante o desenvolvimento da tese.

Prof. Dr. Jorge Timenetsky e seus pós graduando, Nani, Melissa, Lucas, Maurício do laboratório de Micoplasma do ICB-USP pelo apoio durante todos os momentos da tese e pelo processamento das amostras no laboratório meu agradecimento especial.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira pelo ensinamentos de estatística.

Aos ovinocultores pertencentes a União de Criadores de Ovinos e Caprinos de Piedade e Região que disponibilizaram seus animais para que fosse realizada a colheita de material para realização desse estudo, principalmente em nome do Sr. Luis Eduardo Lisboa.

Às residentes da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes Eliza, Daniela e Mariana e aos funcionários Edson, Luizinho, Elias e Francisco.

As secretárias do departamento de Clínica Médica Adelaide Borges, Maria Aparecida, Daura e Patrícia.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, e a todos os professores e funcionários do Departamento de Clínica Médica.

Ao CNPq pela concessão de auxílio financeiro de uma bolsa de mestrado

RESUMO

RIZZO, H. **Avaliação clínica e estudo da ocorrência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade – SP – “Avaliação da infecção sobre a produtividade do rebanho”**. [Clinical avaliation and occurrence studies of mycoplasmas infected ovine female in the Piedade region – State of São Paulo- “Avaliation of the infection in the productivity of the herd”]. 2006. – 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

Com a crescente demanda por produtos ovinos, tem crescido o número de empresários dispostos a investir nessas atividades. Estudos sobre a importância das micoplasmoses e suas diferentes espécies já conhecidas ainda devem ser realizadas no Brasil. Foram estudadas 60 fêmeas da espécie ovina. O material clínico selecionado para analisar foi muco vulvovaginal obtido através de colheita por zaragatoa. Foi obtido o isolamento através de cultivo e a detecção pela técnica de reação em cadeia da polimerase de *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp. e *Acholeplasma laidlawii* em fêmeas de ovinos pela primeira vez no Brasil na região vulvovaginal. A porcentagem de micoplasma genérico detectada nas amostras foi de 75%, de *Ureaplasma* spp. foi de 66,7% e de *Acholeplasma laidwaii* foi de 1,7%. Houve isolamento em placa de 11,7% de *Ureaplasma* spp. do total de amostras processadas e de *Micoplasma* spp. em 8,3%. Não foi possível a identificação da espécie envolvida. Não houve associação da presença de micoplasmas com alterações no trato reprodutivo de fêmeas ovinas. Foi comprovada a infecção de uma fêmea ovina através de monta natural por um macho infectado, provando que uma das principais fontes de infecção dos animais é através do coito.

Palavras-chave: Ovinos. Micoplasma. Ureaplasma.

ABSTRACT

RIZZO, H. **Clinical avaliation and ocurrence studies of mycoplasmas infected ovine female in the Piedade region – State of São Paulo- “Avaliation of the infection in the productivity of the herd”**. [Avaliação clínica e estudo da ocorrência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade – SP – “Avaliação da infecção sobre a produtividade do rebanho”]. 2006. – 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

Sheep industry is growing rapidly in Brazil. However many diseases are the principal bottleneck to the increasing these activities. Among the reproductive diseases the vulvo-vaginites caused by *Mycoplasma* play an important role. Although no studies has been carried out in brazilian sheep herd so far. For that 60 ewes were randomly from different flocks selected at the county of Piedade state of São Paulo, Brazil.

The mucus from vulvovagina was obtained by swab for isolation and detectetion of *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp. and *Acholeplasma laidlawii*. Generic *Mycoplasma* was detected in 75% of the samples, *Ureaplasma* spp. in 66,7% and *Acholeplasma laidwarii* in 1,7%. *Mycoplasma* spp. was isolated 8,3% and *Ureaplasma* spp. in 11,7%. It was not possible the identification of the species found. There was no association of mycoplasmas in the muco on the presence of reproductive problems in the herds. At least in one case, ram with presence of *Mycoplasma* in the semen infected a negative ewe, suggesting the importance of the ram in spreading the bacteria in the heard.

Key words: Ovine. Mycoplasmas. Ureaplasma.

LISTA DE FIGURAS:

	Pág.
Figura 1 - Ficha de exame clínico.....	52
Figura 2 - Cultivo de muco vulvovaginal de ovinos em meio SP4 apresentando crescimento de <i>Mycoplasma</i> spp. (X 40).....	63
Figura 3 - Cultivo de muco vulvovaginal de ovinos em meio SP4 apresentando crescimento de <i>Mycoplasma</i> spp. (X40, X100 e X400).	63
Figura 4 - Cultivo de muco vulvovaginal de ovinos em meio U _B apresentando crescimento de <i>Ureaplasma</i> spp. (X40).....	64
Figura 5 - Cultivo de muco vulvovaginal de ovinos em meio U _B apresentando crescimento de <i>Ureaplasma</i> spp. (X40, X100 e X400).....	64
Figura 6 - Cultivo de muco vulvovaginal de fêmea ovina em meio U _B apresentando crescimento de <i>Ureaplasma</i> spp. e <i>Mycoplasma</i> spp. (X40).....	65
Figura 7 - Cultivo de muco vulvovaginal de fêmea ovina em meio U _B apresentando crescimento de <i>Ureaplasma</i> spp. e presença de espermatozoides após a cobertura por macho sabidamente positivo (X40).....	66
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando “primers” genéricos GPO3/MGSO a partir do DNA de culturas extraído de amostras de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna 01 a 10 - amostras muco vulvovaginal sendo positivas as colunas 2, 4, 5,7 e 9. Coluna 11 - controle negativo das reações com água ultra pura. Coluna 12 - controle positivo da reação com DNA de <i>Mycoplasma bovis</i> . Coluna 13 - Coluna 16 - padrão de peso molecular de DNA – 100 bp.....	67
Figura 9 - Amplificação da subunidade 16S rRNA do gênero <i>Ureaplasma</i> spp com <i>primers</i> UGPF/UGPR. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR a partir do DNA de culturas extraído de amostras de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna de 1 a 14 - amostras muco vulvovaginal sendo positivas as colunas 2, 5, 6,12 e 13. Coluna 14 - controle negativo das reações com água ultra pura.; Coluna 15 controle positivo da reação com DNA do <i>U. diversum</i> ATCC 49782; Coluna 6 - padrão de peso molecular de DNA – 100 bp.....	68
Figura10 - Amplificação da subunidade 16S rRNA, espécie <i>Acholeplasma ladlawii</i> , com <i>primers</i> UNI /ACHA3. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR a partir do DNA de culturas extraído de amostras de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna de 1 - controle positivo da reação com DNA de <i>A. ladlawii</i> . Colunas 2 a 6 amostras muco vulvovaginal sendo positivas as colunas 2 e 3. Coluna 7 - controle negativo das reações com água ultra pura. Coluna 8 - padrão de peso molecular de DNA – 100 bp.....	69

Figura11 - Demonstração do número de amostras e o grau de aproveitamento para o diagnóstico de Ureaplasmas entre a técnica de isolamento e da PCR..... 87

LISTA DE TABELAS:

	Pág.
Tabela 1- <i>Primers GPO3 e MGSO das regiões V2 e V7 do micoplasma genérico.....</i>	58
Tabela 2 - <i>Primers UGPF e UGPR das regiões conservadas do gênero Ureaplasma.....</i>	59
Tabela 3 - <i>Primers UNI- e ACH3 para identificação de Acholeplasma laidlawii.....</i>	60
Tabela 4 - <i>Freqüência de animais positivos para Mycoplasma sp segundo categorias etárias. São Paulo, 2005.....</i>	70
Tabela 5 - <i>Freqüência de alterações na vulva em animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	70
Tabela 6 - <i>Freqüência de alterações da vagina observadas através da inspeção indireta em animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	71
Tabela 7 - <i>Freqüência de vulvovaginite em animais infectados e não infectados por Mycoplasma sp. São Paulo, 2005.....</i>	72
Tabela 8 - <i>Freqüência de alterações no histórico reprodutivo dos animais estudados infectados e não infectados por Mycoplasma sp. São Paulo, 2005.....</i>	72
Tabela 9 - <i>Freqüência de alterações nos diversos sistemas e no escore corporal dos animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp. São Paulo, 2005.....</i>	73
Tabela 10 - <i>Freqüência de animais positivos para Mycoplasma spp. Segundo categorias etárias. São Paulo, 2005.....</i>	74
Tabela 11 - <i>Freqüência de alterações na vulva em animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	74
Tabela 12 - <i>Freqüência de alterações da vagina em animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	75
Tabela 13 - <i>Freqüência de vulvovaginite em animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	76
Tabela 14 - <i>Freqüência de alterações do histórico reprodutivo dos animais estudados infectados e não infectados por Mycoplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	76
Tabela 15 - <i>Freqüência de alterações nos diversos sistemas e no escore corporal dos animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp. São Paulo, 2005.....</i>	77

<i>Tabela 16 - Freqüência de animais positivos para Ureaplasma spp. Segundo categorias etárias. São Paulo, 2005.....</i>	78
<i>Tabela 17 - Freqüência de animais positivos para Ureaplasma spp. Segundo a presença ou não de alterações encontradas no exame clínico específico da região da vulva. São Paulo, 2005.....</i>	78
<i>Tabela 18 - Freqüência de alterações na vagina em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	78
<i>Tabela 19 - Freqüência de vulvovaginite em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	79
<i>Tabela 20 - Freqüência de alterações do histórico do animal relacionados ao sistema reprodutivo em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	79
<i>Tabela 21 - Freqüência de alterações nos diversos sistemas e no escore corporal dos animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp.. São Paulo, 2005.....</i>	80
<i>Tabela 22 - Freqüência de animais positivos para Ureaplasma spp. Segundo categorias etárias pela técnica de cultura em placa. São Paulo, 2005.....</i>	81
<i>Tabela 23 - Freqüência de alterações na vulva em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. e isolados em meio de cultura em placa. São Paulo, 2005.....</i>	81
<i>Tabela 24 - Freqüência de alterações na vagina em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. isolados em meio de cultura em placa. São Paulo, 2005.....</i>	82
<i>Tabela 25 - Freqüência de vulvovaginite em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. e isolados em meio de cultura em placa. São Paulo, 2005.....</i>	83
<i>Tabela 26 - Freqüência de alterações do histórico do animal relacionados ao sistema reprodutivo em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. isolados em meio de cultura em placa. São Paulo, 2005.....</i>	84
<i>Tabela 27 - Freqüência de alterações nos diversos sistemas e no escore corporal dos animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. isolados em meio de cultivo em placa. São Paulo, 2005.....</i>	84
<i>Tabela 28 - Porcentagem de animais positivos nas 60 amostras de zaragatoza vulvovaginal, segundo a técnica diagnóstica utilizada. São Paulo, 2005.....</i>	99

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
°C	Celsius
gr	Gramas
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
=	Igual
Kb	Kilobyte
Kb/ha	Kilogramas/hectare
Kpb	kilo pares de base
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
-	Menos
μL	Microlitros
μm	Micrometros
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimol
p	Nível de significância
Nº	Número
pb	Pares de bases
PBS	Phosphated buffer saline
pmol	Picomoles

PCR	Polimerase chain reaction
%	Porcentagem
rpm	Rotação por minuto
s	Segundos
UI	Unidade Internacional
X	Vezes

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
3 OBJETIVOS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS E CATEGORIZAÇÃO AMOSTRAL	49
4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS	50
4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS	50
4.4 ANÁLISE LABORATORIAL	53
4.4.1 <i>Meios de Cultivo</i>	53
4.4.2 <i>Meios Líquido/ Sólido SP4 (TULLY, 1995)</i>	53
4.4.3 <i>Meios Líquido U_B (RUHNKE; ROSENDAL, 1994)</i>	54
4.4.4 <i>Meios Sólido U_B (RUHNKE; ROSENDAL, 1994)</i>	54
4.4.5 <i>Subcultivo de Amostras de Referência de Micoplasma</i>	55
4.4.6 <i>Cultivo de Micoplasma de Amostras Clínicas</i>	55
4.4.7 <i>Método de Extração de DNA</i>	56
4.4.8 <i>Extração do DNA das Cepas de Referência e Amostras Clínicas</i>	56
4.4.9 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	57

4.4.10	<i>Ligonucleotídeos Iniciadores (primers) Genéricos</i>	57
4.4.11	<i>Oligonucleotídeos Iniciadores (primers) para o Gênero Ureaplasma</i>	58
4.4.12	<i>PCR espécie-específica</i>	59
4.4.13	<i>A. laidlawii</i>	59
4.4.14	<i>Detecção do Produto Amplificado</i>	59
4.5	ESTATÍSTICA.....	61
5	RESULTADOS	62
5.1	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	62
5.1.1	<i>Cultivo das Amostras de Muco Vulvovaginal para Detecção de Micoplasma</i>	62
5.1.2	<i>Cultivo das Amostras de Muco Vulvovaginal para Detecção de Ureaplasmas</i>	64
5.1.3	<i>Cultivo das Amostras de Muco Vulvovaginal de Fêmeas Ovinas com Crescimento Associado</i>	65
5.1.4	<i>Cultivo das Amostras de Muco Vulvovaginal de Fêmeas Ovinas no mesmo Pasto que Macho Positivo Durante o Projeto Piloto</i>	66
5.1.5	<i>Detecção de Micoplasmas em Muco Vulvovaginal Ovino por meio da PCR Utilizando Primers Genéricos</i>	67
5.1.6	<i>Detecção de Ureaplasma spp. em Muco Vulvovaginal Ovino por meio da Técnica de PCR</i>	68
5.1.7	<i>Detecção de Acholeplasma laidlawii em Muco Vulvovaginal Ovino por meio da Técnica de PCR</i>	69
5.1.8	<i>Resultados das Frequências de Micoplasmas e dos Sinais Estudados por Meio da Técnica de PCR</i>	70

5.1.9	<i>Resultados das Freqüências de Mycoplasma spp. e dos Sinais Estudados por Meio do Cultivo em Placa</i>	73
5.1.10	<i>Resultados das Freqüências de Ureaplasma spp. e dos Sinais Estudados por Meio da Técnica de PCR</i>	78
5.1.11	<i>Resultados das Freqüências de Ureaplasma spp. e dos Sinais Estudados pela Técnica de Cultura em Placa</i>	82
5.1.12	<i>Resultados das Freqüências de Acholeplasma laidlawii e dos Sinais Estudados por Meio da Técnica de PCR</i>	86
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÕES	100
8	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira, em vista do grande crescimento, vem alcançando um destaque cada vez maior na pecuária, apresentando-se como uma excelente fonte de renda para os pequenos e médios produtores rurais de todas as regiões brasileiras. O aumento na produção e na produtividade colocará a ovinocultura em condições de igualdade com outras atividades pecuárias mais competitivas. O Brasil possui um rebanho caprino e ovino de aproximadamente 12,6 e 13,9 milhões de cabeças respectivamente, distribuídos por todo país. Mesmo se tratando de um sistema de criação muito antigo, a ovinocultura, ainda, apresenta uma série de problemas, que dificultam a produção econômica desses animais e necessitam de urgentes soluções, visando minorar os grandes prejuízos que causam a essa produção agropastoril. De fundamental importância dentre esses fatores, destacam-se as enfermidades infecto-contagiosas ainda muito comuns nos rebanhos brasileiros, associadas a outras, ainda consideradas como emergentes. Entre elas poderiam ser destacadas as verminoses, as broncopneumonias, as doenças dos recém-nascidos, a linfadenite caseosa e as micoplasmoses (CORDEIRO, 2001).

O abate mundial de caprinos e ovinos no período de 1991 a 2000 cresceu 7,5 %. Em 1970 foram abatidos no país 752 mil unidades caprinas e 692 mil unidades ovinas. Em 1992, esses números elevaram-se para 1.639 milhões de cabeças caprinas e 1.196 milhões de cabeças ovinas, representando um crescimento do abate da ordem de 45,9 % e 57,8 % para caprinos e ovinos, respectivamente. A produção brasileira de peles de caprinos e de ovinos deslanados, em 2000, foi de 6 milhões de unidades. Já a de ovinos lanados foi de 1,3 milhões de unidades.

A produção média atual de carne ovina no semi-árido Nordestino é de 2,8 kg/ha na caatinga nativa. Entretanto, pode alcançar de 31,4 kg/ha a 71,2 kg/ha com o uso de técnicas de manipulação da vegetação nativa. A produtividade da ovinocultura de corte no Brasil ainda é baixa. Uma das razões está no regime de manejo da exploração que, predominantemente, é o extensivo, com alta dependência da vegetação nativa, utilização de raças não especializadas, uso de práticas rudimentares de manejo, assistência técnica deficitária, baixo nível de organização e de gestão da unidade produtiva.

Com a crescente demanda por produtos caprinos e ovinos, tem crescido o número de empresários dispostos a investir nessas atividades, a agroindústria instalada e as tecnologias já disponibilizadas pela pesquisa, capazes de atender aos diversos segmentos da cadeia produtiva, a ovinocultura irá se destacar no cenário brasileiro como atividade de grande impacto sócio-econômico(CORDEIRO, 2001).

Evoluindo de criações voltadas para a subsistência, hoje a expansão do agronegócio da caprinovinocultura está transformando o cenário produtivo no Brasil. O mercado vem crescendo rapidamente, exigindo uma maior preocupação com aspectos sanitários. A produção de caprinos e ovinos deve ser fundamentada em sistemas de exploração que possam garantir melhores condições sanitárias para estes animais, através de medidas de biosegurança e de exames diagnósticos confiáveis e acessíveis. Através da Instrução Normativa Nº 87 da Secretaria de Defesa Agropecuária, de 10 de dezembro de 2004, foi aprovado o Regulamento Técnico do PNSCO (Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos). O controle e erradicação das doenças de caprinos e ovinos, por meio de ações sanitárias e de vigilância epidemiológica definidas pelo DDA (Departamento de Defesa Animal) e executadas pelos serviços oficiais e médicos veterinários

cadastrados, estão entre os objetivos do Programa (Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos, 2004).

A micoplasmose é uma enfermidade infecciosa que apresenta quadro clínico complexo, cuja ocorrência tem aumentado nestes últimos anos em nosso meio criatório, representando atualmente sério problema nos principais rebanhos leiteiros do nosso Estado (BENESI, 1985; D'ANGELINO, 1982).

O objetivo desta pesquisa é estabelecer uma proposta para avaliação e conduta ordenadas, que sirvam de modelo em nível de campo, considerando-se as informações básicas, como ocorrência regional das micoplasmoses e seu impacto reprodutivo no rebanho através de observações de manejo e alimentação, condições ambientais e climáticas; que de forma integrada e conjuntamente com a análise econômica para tomada de decisão, possa contribuir na resolução dos problemas em nível local, e refletir posteriormente numa conduta regional; estudando-se os plantéis ovinos em regime de criação extensiva e semi-intensiva para produção de carne, da Região de Piedade do Estado de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Micoplasma possuem distribuição mundial e tem sido descrito internacionalmente como responsáveis de distúrbios reprodutivos em várias espécies, sendo responsáveis por casos de: vulvovaginite granular, salpingite, endometrite, mastite, infertilidade, perda embrionária, abortos, morte neonatal, síndrome do bezerro fraco, vesiculite seminal, balanopostite e epididimite. Muitos ainda consideram a maioria dos micoplasmas de origem animal como oportunistas ou comensais, sendo poucos reconhecidos como patogênicos causadores de infertilidade.

A identificação do micoplasma ocorreu em 1898 por Nocard na França em um surto de pleuropneumonia contagiosa bovina e a primeira referência de isolamento de micoplasma em cultura de células é de 1967.

2.1 MOLLICUTIS

Micoplasma, Ureaplasma e Acholeplasma são da família Mycoplasmatacea, pertencente a classe Mollicutes. Existem mais de 200 espécies de Mollicutes (RUFFIN, 2001) composta por 5 ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Achleoplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incetae sedis*) e 14 gêneros (*Micoplasma*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Achleplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelothrix*, *Bulleidia*,

Holdemania e *Solobacterium*) (BERGEY'S, 2001), onde cinco deles podem ser encontrado em animais: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma* e *Asteroplasma*. Dentre eles somente *Mycoplasma* e *Ureaplasma* são patogênicos para animais e são mais comumente encontrados (RUFFIN, 2001). São conhecidas 102 espécies de *Mycoplasmas sp.*, além de muitas outras espécies que ainda não foram nomeadas e estão sendo isoladas (RAZIN et al., 1998). Os *Mycoplasmas* são considerados os menores organismos de vida livre, capazes de se auto replicarem (BASEMAN; TULLY, 1997; RUFFIN, 2001) e se caracterizam pela falta de parede celular, pelas colônias em forma de "ovo-frito" e pelo pequeno tamanho em relação a outras bactérias, (RAZIN; TULLY, 1983), em geral, aproximam-se das dimensões dos maiores vírus (0,2 a 0,4 μ m). Poucas espécies, entretanto, apresentam-se espiraladas, atingindo cerca de 100 μ m. A forma filamentosa é "multinucleada", podendo ocorrer em determinados momentos da multiplicação, pela falta de sincronia entre a septação na divisão celular e a replicação do DNA. Assim, além da fissão binária, a partir dos filamentos, formam-se cadeias ou conjuntos de pequenas células de micoplasma viáveis que se desprendem, e, sob pressão em filtros, podem transpor a porosidade de 0,22 μ m (BASEMAN; TULLY, 1997; TIMENETSKY; METTIFOGO, 2002). O crescimento destes microrganismos em meio sólido é expresso em pequenas colônias de 50 – 500 μ m de diâmetro, usualmente em forma de "ovo frito", que são visualizadas com o auxílio de microscópio estereoscópio. Em meio líquido, o crescimento geralmente não causa turvação, provocando somente alteração no pH, revelado por um indicador presente no meio de cultura (RAZIN, 1995).

Possuem um pequeno genoma (< 1380 kb) sendo o menor conhecido entre os procariotos. Membros desta classe têm sido divididos em dois grupos, de acordo

com o tamanho do genoma; um é composto pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, que possui cerca de 770 a 800 Kpb, e o outro formado pelos gêneros *Acholeplasma*, *Spiroplasma* e *Anaeroplasma*, que possuem o dobro do genoma (HEREMANN, 1992).

O tamanho pequeno do genoma estabelece restrição ao número de proteínas sintetizadas e, como conseqüência, os *Micoplasmas* possuem limitadas atividades metabólicas, portanto, são dependentes de vários compostos para o crescimento, resultando em uma barreira para a pesquisa desses agentes (MILES; NICHOLAS, 1998). Em conseqüência eles usualmente requerem uma associação íntima com células de superfície de mamíferos e manifestam complexos requerimentos nutricionais para o crescimento *in vitro* (RUFFIN, 2001). Muitas espécies de *Micoplasmas* expressam variavelmente na superfície celular antígenos estruturalmente heterogêneos. Modificações nos genes que codificam moléculas de adesão revelam distintos modos de mutação capazes de gerar mudanças no tamanho e diversidades antigênicas das moléculas de superfície, indicando um importante mecanismo na patogenicidade das infecções por *Micoplasmas* por mimetizar e escapar da resposta imune. Estas variações podem alterar os mecanismos de colonização e penetração dos *Micoplasmas* nos tecidos (NICOLSON et al., 1999).

2.2 ASPECTOS CLÍNICOS DAS MICOPLASMOSES

Micoplasmas possuem predileção por membranas mucosas e serosas do trato urogenital, trato respiratório, articulações, conjuntiva e glândula mamária de animais

causando doenças como vulvovaginites, vesiculite, pneumonia, artrite e mastite (CLAYDE, 1983).

Um grande número de espécies de Micoplasmas tem sido isolado de animais. Muitos desse organismos são comensais apatogênicos que vivem nas superfícies mucosas, especialmente tratos genitais e respiratório. Alguns são de patogenicidade relativamente baixa, acarretando apenas uma moléstia branda, ou se tornando patogênicos apenas quando em conjunto com outras injúrias.

As espécies patogênicas do gênero *Mycoplasma* foram descritas como responsáveis pelo aparecimento de diversas doenças, tais como: pleuropneumonia, pneumonia, agalaxia, mastite, artrite e poliartrite, conjutivite e ceratoconjutivite (BENESI, 1985; DAMASSA et al., 1992; D'ANGELINO et al., 1982; GREGORY et al., 2003). Estudos realizados experimentalmente com ovinos e caprinos infectados intra-articularmente mostraram que após 5 dias da inoculação os animais apresentavam edema peri-articular e subcutâneo com proliferação irregular da membrana sinovial e moderada infiltração de linfócitos, monócitos e polimorfonucleares e presença de um exsudato fibrinoso (GREGORY et al.,¹ em fase de elaboração, [200-]; WANPEOEL; EFSTRATIOU; BLACKBURN, 1977). Em caprinos, a espécie *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides* foi descrita como a mais freqüentemente isolada a partir de punção articular (ROSENDAL et al., 1979). *Mycoplasma capricolum* foi descrita como causadora de poliartrite em ovinos, após desencadear um quadro de pneumonia intersticial e septicemia, em trabalho experimental desenvolvido por Taoudi et al., (1987). As infecções causadas por *Mycoplasma* spp., determinam manifestações articulares semelhantes às que

¹ Gregory, L. Avaliação clínica de caprinos acometidos por artrite. Diferencial entre artrite viral (CAE) e bacteriana (*Mycoplasma* spp.) em dois casos atendidos nos Hospital de bovinos e pequenos ruminantes da FMVZ-USP a ser editado (200-).

ocorrem na infecção causada pelo vírus da artrite encefalite dos caprinos (ROSSINI et al., 1986).

Apesar dessa característica de especificidade de hospedeiros, atualmente vem aumentando a lista de isolamentos de Micoplasmas em hospedeiros que não são típicos de certas espécies como: *Mycoplasma canis* em pulmão de bovinos (NICHOLAS et al., 1995), *Mycoplasma salivarium* que é um Micoplasma bucal de humanos em suínos, *Acholeplasma oculi* comum em caprinos que foi isolado em líquido amniótico de humanos (RAZIN, 1992) e *Mycoplasma fermentans* mais comumente em humanos isolado em lesão vulvar de ovinos (NICHOLAS et al., 1998).

2.3 PRINCIPAIS MICOPLASMOSES QUE AFETAM PEQUENOS RUMINANTES

Recentemente as enfermidades causadas por agentes do gênero *Mycoplasma* tem sido ativamente estudadas e vem assumindo importância econômica considerável, principalmente entre os ovinos e caprinos. Entre estes animais, várias são as enfermidades que podem ocorrer em decorrência da presença de *Mycoplasma* nos diferentes sistemas orgânicos. Os micoplasmas normalmente provocam infecções crônicas, sugerindo uma capacidade em desenvolver um mecanismo de escape frente ao sistema imunológico do hospedeiro, seja em decorrência de características como a de apresentar variação nas suas proteínas de superfície, ou em ter capacidade de provocar alterações nos componentes da resposta imune. Embora os achados histopatológicos variam segundo a doença

determinada e a espécie de micoplasma envolvida, um dado em comum, é a característica reação inflamatória crônica, devido à infiltração clássica de células mononucleares nos tecidos afetados (GREGORY et al., 2003).

2.3.1 *Mycoplasma agalactiae*

Esse Micoplasma causa agalactasia contagiosa, uma das mais importantes doenças de ovinos e caprinos (DAMASSA; WAKENELL; BROOKS, 1992). Há relatos do envolvimento do *Mycoplasma agalactiae* com casos clínicos de vulvovaginite granular em caprinos. (BENESI, 1985; GIL et al., 2003; SINGH; RAJYA; MOHANTY, 1974,1975).

2.3.2 *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides* Large Colony (*MmmLC*)

MmmLC é membro do *Mycoplasma mycoides cluster*, um grupo de Micoplasmas com características sorológicas, genômicas e antigênicas semelhantes (BENESI, 1985; DAMASSA; WAKENELL; BROOKS, 1992). Embora o biotipo LC não esteja associado com doenças que são clinicamente e patologicamente bem definida, existem alguns indicativos que esses Micoplasmas poderiam estar envolvidos em condições patológicas em pequenos ruminantes. (NAGLIC et al., 2001). Esses Micoplasmas podem ser isolados de caprinos com poliartrite, conjuntivite, ceratite, pneumonia, com abscessos cervicais (ROSENDAL; ERNØ;

WYAND, 1979) e de fetos abortados (RODRÍGUEZ et al., 1995). Também foi descrito que o biotipo *MmmLC* causa doenças genitais ulcerativas em ovinos na África do Sul (KIDANEMARIAM, 2003; TRICHARD et al., 1993).

2.3.3 *Mycoplasma mycoides subespécie capri*

É um membro do *Mycoplasma mycoides cluster* e foi considerado por muitos anos como causador da pleuropneumonia contagiosa caprina (CCPP) em caprinos até MacOwan e Minette (1976) descreveram o isolamento de um novo *Mycoplasma* designado F38 em casos de pneumonia fibrinosa. Embora altamente virulento em condições experimentais, não é mais considerado a causa primária da CCPP clássica. Esse organismo parece ser específico de caprinos e causa septicemia e poliartrite (RODRIGUEZ et al., 1998), mas não é reconhecido como causador de doenças naturais em ovinos. Trabalho anterior de prevalência de *Micoplasmas* no trato genital de ovinos, demonstrou isolamento de *Mycoplasma mycoides subespécie capri* em um rebanho com problemas reprodutivos (KAPOOR; SINGH; PATHAK, 1984).

2.3.4 *Mycoplasma capricolum subespécie capripneumoniae*

Em 1976, MacOwan e Minette descreveram o isolamento de um novo micoplasma (F38) de CCPP em um surto no Kenya e demonstrou que ele era causador de uma pneumonia altamente contagiosa em caprinos. Mais tarde, Leach,

Ernø e MacOwan (1993) propuseram designar o *Mycoplasma capricolum* F38 como *Mycoplasma capricolum capripneumoniae*, e desde então seu nome tem sido amplamente usado como agente causador da CCPP clássica.

2.3.5 *Mycoplasma capricolum*

Surtos de artrite ovina, pneumonia e conjuntivites (TAOUDI; JOHNSON; KHEYYALI,1987) causado por *Mycoplasma capricolum* tem sido descrito. Existem evidências que o *Mycoplasma capricolum* está presente no conduto auditivo de caprinos e ovinos (COTTEW; YEATS,1982) mucosa respiratória e genital em caprinos (DAMASSA; BROOKS; HOLMBERG,1984) e tem sido isolado em casos de vulvovaginite e balanopostite em ovinos (JONES, 1983). DaMassa, Brooks e Adler (1983) descreveram o envolvimento desse *Mycoplasma* em casos de severa pneumonia com alta mortalidade em animais jovens.

2.3.6 *Mycoplasma arginini*

Embora essa espécie não seja específica de ovinos e caprinos (RUFFIN, 2001), relatos indicam que ele tem sido isolado de trato genital feminino (JONES, 1979; MCCAUGHEY; BALL, 1979), trato genital masculino de ovinos com orquite (LANGFORD, 1975) e de animais aparentemente saudáveis (KAPOOR; SINGH;

PATHAK; 1984) e trato respiratório e genital de pequenos ruminantes (RUFFIN, 2001).

2.3.7 *Mycoplasma ovipneumoniae*

Afeta ovinos e caprinos e é um dos muitos agentes associados com o complexo de pneumonia da ambas as espécies. Foi provado que esse agente causa uma pneumonia proliferativa exsudativa juntamente com *Mannheimia haemolytica* (ROSENDAL, 1994).

2.3.8 *Mycoplasma conjunctivae*

Tem sido isolado em casos clínicos de ceratoconjutivite ovina juntamente com outras bactérias e foi sugerido que ele seja o agente primário dessa doenças (JONES et al., 1976). Em 2003 foi relatado o primeiro surto de ceratoconjutivite causado por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos criados no estado de São Paulo (GREGORY et al., 2003), há relato de inoculações experimentais causando a doença que possui uma rápida transmissão no rebanho (RUFFIN, 2001).

2.3.9 *Mycoplasma* sp 2D/ *Mycoplasma ovino* sorogrupo 11

Esse *Mycoplasma*, que ainda não é classificado como espécie, é conhecido como *Mycoplasma ovino* sorogrupo 11 ou cepa 2D, e vem sendo relacionado a casos de vulvovaginite e problemas reprodutivos de ovinos e caprinos na Austrália, Estados Unidos, Índia, Inglaterra, França e Nigéria (NICHOLAS et al., 1999).

O *Mycoplasma* biótipo designado 2D foi isolado de ovinos na Austrália em 1972 de amostras de zaragatoa prepucial e vaginal de animais sem problemas reprodutivos aparente (CARMICHAEL et al., 1972). Enquanto Cottew, Lloyd e Parsonson (1974) isolaram de ovelhas com vulvovaginite. Esses dois casos contrastam com os achados de Livingstone Junior e Gauer (1983) que isolaram esse micoplasma de 4 rebanhos sendo dois sadios e dois com problemas reprodutivos.

Mycoplasma 2D possui características bioquímicas semelhantes ao *M. agalactiae* (ERNØ et al., 1978). *Mycoplasma ovino* sorogrupo 11 foi isolado, na Inglaterra, do trato genital de ovelhas que apresentavam problemas de infertilidade (AYLING; BASHIRUDDIN; NICHOLAS, 2004; NICHOLAS et al., 1999), esta espécie incomum foi demonstrada ser quase idêntica ao *M. bovigenitalium* desde então é provável ser reclassificado como tal (NICHOLAS et al., 2002). Em relatos de animais experimentalmente infectados observou-se que o *Mycoplasma ovino/caprino* sorogrupo 11 é patológico para o trato genital caprino causando severa vulvovaginite granular, cervicite linfática, endometrite e leve ooforite (RANA; GUPTA; BANGA, 1993).

2.3.10 *Mycoplasma fermentans*

Mycoplasma fermentans é ocasionalmente isolado em material clínico de humano mas seu habitat natural não é conhecido. Causa infecção renal em pacientes com AIDS (BAUER et al., 1991) e além disso é causador de infecção sistêmica fatal em humanos (LO et al., 1989). Ele é descrito no líquido amniótico e em casos de uretrites e cervicites, no entanto seu papel nessas doenças não é claro (BLANCHARD et al., 1993). Apesar de não ser um hospedeiro de ovinos foi isolado por Nicholas et al. (1998) de zaragatoa vaginal de uma úlcera, juntamente com *Histophilus ovis* e *Arcanobacterium pyogenes*, que são associados a doenças reprodutivas, citando que esse *Mycoplasma* pode ter contribuído para o aparecimento das lesões.

2.3.11 *Mycoplasma putrefaciens*

Mycoplasma putrefaciens está entre os de maior tamanho de *Mycoplasmas* sendo considerado responsáveis pela Síndrome da Agalactia Contagiosa (SAC) em pequenos ruminantes, além disso causa em caprinos mastites e artrites e foi isolado em oviduto, útero e testículo de ovinos com síndrome da agalactia contagiosa (GIL et al., 2003).

2.3.12 *Acholeplasma laidlawii*

Essa espécie não possui um hospedeiro específico e é mais freqüentemente isolado em ovinos e caprinos (BENESI, 1985; JONES et al., 1979, KAPOOR; SINGH; PATHAK, 1984), mas é geralmente considerado não patogênico. *A. laidlawii* obteve a maior freqüência de isolados de prevalência de Micoplasmas em trato genital de ovinos, sendo considerado da flora saprofítica desses animais, pois foi isolado principalmente de animais aparentemente saudáveis (KAPOOR; SINGH; PATHAK, 1984). No entanto Gupta et al. (1990) observaram casos de vulvite, vaginite, cervicite e metrite após infecção experimental.

2.3.13 *Acholeplasma axanthum*

Tem sido isolado em vários hospedeiros, principalmente bovinos, eqüinos, suínos e pássaros (TULLY, 1979). Até então não era conhecido isolamentos em ovinos até que Jones et al. (1983) o isolaram do trato genital de ovelhas.

2.3.14 *Acholeplasma Oculi*

Foi isolado primeiramente em casos de ceratoconjutivite em cabras em Minnesota, Alabamba (AL-AUBAIDI et al., 1973). Subseqüentemente foi descrito o isolamento em trato genital de cabras (KUMAR; PATHAK, 1978). Tiwana e Singh (1982) isolaram ovelhas com quadros de vulvovaginite sendo o primeiro descrito na literatura.

2.3.15 *Ureaplasma spp.*

Atualmente, são reconhecidas sete espécies de Ureaplasmas, uma de origem humana e as outras restantes são de origem bovina, canina, felina e aviária. Esse Micoplasma foi isolado pela primeira vez de bovinos em 1967, do trato urogenital de vacas aparentemente sadias, sendo descrito como agente não-patogênico por muitos anos, acreditando-se que pertencia à microbiota natural (TAYLOR-ROBINSON et al., 1967). Atualmente é documentado internacionalmente em bovinos sendo responsável por casos de vulvovaginite granular, salpingite, endometrite, mastite, infertilidade, perda embrionária, abortos, morte neonatal, síndrome do bezerro fraco, vesiculite seminal, balanopostite e epididimite (DOIG et al., 1980a²

² DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L.; PALMER, N. C. Experimental bovine genital ureaplasmosis. I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. *Can. J. Comp. Med.*, v. 44, p. 252-258, 1980a.

apud CARDOSO, 1998, p. ; DOIG 1981a³ apud CARDOSO, 1998, p.; EAGLESOME et al., 1992⁵ apud CARDOSO, 1998, p. ; ERA et al., 1995⁶ apud CARDOSO, 1998, p. ; LEÓN et al., 1994⁷ apud CARDOSO, 1998, p. ; LEÓN et al., 1995⁸ apud CARDOSO, 1998, p. ; MILLER et al., 1983⁹ apud CARDOSO, 1998, p. ; MILLER et al., 1994¹⁰ apud CARDOSO, 1998, p. ; MULIRA et al., 1992¹¹ apud CARDOSO, 1998, p. ; RUHNKE et al., 1978¹² apud CARDOSO, 1998, p. ; RUHNKE et al., 1984¹³ apud CARDOSO, 1998, p. ; THORNBUR, 1982¹⁴ apud CARDOSO, 1998, p. ; YAMAMOTO et al., 1976¹⁵ apud CARDOSO, 1998, p.)

Os Ureaplasmas isolados de ovinos foram estudados por Ball et al. (1985) e Livingstone Junior e Gauer (1978,1982) por meio de inoculações experimentais, sendo o sorotipo IX relacionado como responsável por infertilidade e aborto em ovelhas. Estes Ureaplasmas não receberam ainda a designação de espécie, sendo apenas conhecidas suas características sorológicas, nas quais é baseada a classificação em nove sorotipos. Adicionalmente, o conteúdo de DNA e de polipeptídeos indicaram maior similaridade com *Ureaplasma diversum*, sugerindo que o Ureaplasma ovino/caprino não pode ser considerado uma nova espécie e sim um subgrupo do *Ureaplasma diversum* (HOWARD; POCOCK, 1983; KOTANI; NAGATOMO; OGATA, 1980).

³ DOIG, P. A. Bovine genital mycoplasmosis. *Can. Vet. J.*, v. 22, p. 339-343, 1981a.

⁵ EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M.; STEWART, R. B. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. Haemophilus sommus, Mycoplasma spp. and Ureaplasma spp. Chlamydia; Pathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. *Veterinary Bulletin*, v. 62, p. 887-910, 1992.

⁶ ERA, falta referências não loc. na tese de CARDOSO

⁷ LEÓN, B. A.; CAMPOS, E.; BOLAÑOS, H.; CABALLERO, M.; PADILLA, M. Aislamiento de la bacteria Ureaplasma sp en el tracto reproductivo de vacas lacheradas de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, v. 42, p. 9-13, 1994.

⁸ LEÓN, B. A.; CAMPOS, E.; BOLAÑOS, H.; CABALLERO, M. Factores de riesgo para las infecciones causadas por Ureaplasma diversum en vacas de un ambiente tropical. *Rev. Biol. Trop.*, v. 43, p. 21-25, 1994.

⁹ 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. 267-373, 1983.

¹⁰ MILLER, R. B.; CHELMONSKA-SOYTA, A.; SMITS, B.; FOSTER, R.; ROSENDAL, S. Ureaplasma diversum as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet. Clin. North. Am.: Food An. Pract.*, v. 10, p. 479-490, 1994.

¹¹ MULIRA, G. L.; SAUNDERS, R. J.; BARTH, D. A. Isolation of Ureaplasma diversum and Mycoplasma from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. *Can. Vet. J.*, v. 33, p. 46-49, 1992.

¹² RUHNKE, H. L.; DOIG, P. A.; MACKAY, A. L.; GAGNON, A.; KIERSTEAD, M. Isolation of Ureaplasma from bovine granular vulvitis. *Canadian Journal Comparative Medicine*, v. 42, n. 2, p.151-155, 1978.

¹³ 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, 1978.

¹⁴ THORNBUR, P. M. Ureaplasma association with bovine infertility in south-west Scotland. *Veterinary Record*, v. 111, p. 519. Abstract, 1982

¹⁵ YAMAMOTO, K.; HARASAWA, R.; OGATA, M.; MIURA, T.; NAKANE, H. Bacteriological examination of bovine pneumonic lungs in Japan. *Jap. J. Vet. Sci.*, v. 38, p. 7-14, 1976

Ureaplasma ssp. é associado com pneumonia, cercoconjutivite e vulvite granular na espécie bovina e com infertilidade e vulvite granular na espécie ovina (LIVINGSTON JR.; GAUER, 1982) apesar de relatos de isolamento de *Ureaplasma* de animais saudáveis (MCCAUGHEY; BALL, 1979, 1981).

2.4 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES NO TRATO REPRODUTIVO CAUSADAS PELAS MICOPLASMOSES

Os distúrbios reprodutivos dos animais são importantes fatores que interferem na economia agropecuária e são normalmente originados de deficiências de manejo, falhas de origem genética, influências do meio ambiente e doenças infecciosas. Os micoplasmas incluem-se entre os agentes causadores de infecções no trato reprodutivo dos animais (CARDOSO et al., 2001; RUHNKE et al., 1978; SHEPARD et al., 1974).

A presença de Micoplasmas no trato reprodutivo dos animais, como de bovinos, a espécie animal mais estudada, e a associação com patologias foi considerada controversa alguns anos atrás, pois animais sadios eram encontrados como portadores destas bactérias. Atualmente, os dados das infecções naturais e experimentais causando abortos e infertilidade em bovinos, além de surtos da síndrome de vulvovaginite granular (VVG) comprovaram a importância dos micoplasmas como patógenos do sistema reprodutivo (CHENOWETH, 1999; DOIG et al., 1979; REID et al., 1989, SARDERSON; CHENOWETH, 1999).

Normalmente os micoplasmas são espécie-específicos, ou seja, determinadas

espécies provocam uma doença em hospedeiros definidos. No entanto, encontramos algumas espécies que são ubíquas, como *Mycoplasma arginini*, ou mesmo saprófitas, a exemplo do *Acholeplasma laidlawii*. Nos ovinos e caprinos, diversos estudos relataram a presença de um complexo de Micoplasmas comuns a estas espécies de animais sendo associadas aos distúrbios reprodutivos (JONES et al., 1983; NICHOLAS et al., 1999).

2.4.1 *Mycoplasma* spp.

As informações obtidas em estudos anteriores não estabelecem claramente a causa, epidemiologia, características clínicas, imunopatologia e controle da vulvovaginite e balanite. Além disso pode-se fazer confusão devido os diferentes nomes usados por pesquisas realizadas em diferentes países nas descrições das lesões. Dentre os nomes que são dados a essa síndrome estão: vulvovaginite ulcerativa (IHEMELANDU, 1972) vulvovaginite (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974), balanite e vulvovaginite (WEBB; CHICK, 1976), vulvovaginite granular (DOIG; RUHNKE, 1977), vulvites (BALL; MCCAUGHEY, 1982), balanite ulcerativa e vulvite (DUNN, 1996), balanopostite ulcerativa e vulvovaginite (KIDANEMARIAM, 2003; TRICHARD et al., 1993).

No entanto o isolamento de agentes infecciosos associados com a doença não tem demonstrado a constância de um organismo específico (WEBB; CHICK, 1976). Sinais clínicos e exames microbiológicos são a base para o diagnóstico da vulvovaginite e balanopostite. O surgimento dos sinais clínicos da balanopostite

ulcerativa e vulvovaginite pode variar, dependendo da invasão bacteriana secundária, severidade e tempo da lesão. Isto proporciona uma inconsistências na descrição dos sinais clínicos por vários autores (DENT, 1971; TRICHARD et al., 1993, KIDANEMARIAM, 2003; WEBB; CHICK 1976). Além disso as dificuldades de diagnóstico da doença se dá devido ao fato de que não há uma constância de isolamento de só um patógeno.

Dentre as espécies com potencial patogênico para causar infecções genitais em pequenos ruminantes estão incluso *Mycoplasma capricolum* (JONES, 1983; JONES et al., 1983), *Mycoplasma arginini* (JONES, 1983), *Mycoplasma mycoides mycoides* (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; TRICHARD et al., 1993, KIDANEMARIAM, 2003), *Mycoplasma agalactiae* (JONES, 1983), *Acholeplasma laidlawii* e *Acholeplasma axantum* (JONES et al., 1983; KAPOOR; SINGH; PATHAK, 1984), Ureaplasma (BALL; MCCAUGHEY, 1979,1982; LIVINGSTONE JR.; GAUER, 1982). Embora espécies de *Acholeplasma* tenha sido isolado de animais com vulvovaginite (KAPOOR et al., 1984), seu potencial e seu papel na etiologia e desenvolvimento da doença ainda é incerto.

Muitos trabalhos que acreditavam que balanopostite ulcerativa e vulvovaginite fosse uma doença infecciosa mas não associada aos micoplasmas ou bactérias, sugeriram que um vírus pudesse ser o causador. Porém a investigação de uma etiologia virótica em cultura de tecido e microscopia eletrônica não tem revelado o envolvimento de nenhum vírus sobre casos de balanite ulcerativa e vulvite em ovinos (TRICHARD et al., 1993; WEBB; CHICK, 1976.). Embora nenhum vírus estivesse sido constantemente isolado simultaneamente com a doença, numerosas bactérias patogênicas foram isoladas das lesões (BALL; MCCAUGHEY, 1982). O papel das bactérias secundárias na progressão da infecção por *Mycoplasma* e *Ureaplasma* e

tem suporte em relatos que as lesões clínicas melhoram depois de tratamento antibacteriano de amplo espectro (BALL; MCCAUGHEY, 1982).

Lesões ulcerativas da vulva, pênis e prepúcio associados com sorotipos de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* tem sido descrito mundialmente (JONES et al., 1983). *Mycoplasma* e *Ureaplasma* tem sido isolado juntos ou separadamente em carneiros e ovelhas acometidos por doenças associadas a vulvovaginite (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974), vulvovaginite e vulvite granular (DOIG; RUHNKE, 1977), vulvite (BALL; MCCAUGHEY, 1982) e balanopostite ulcerativa e vulvovaginite (TRICHARD et al., 1993).

A ocorrência de vulvovaginite tem sido descrita antes do cio (MCCAUGHEY; BALL, 1995), durante a estação de monta (JONES et al., 1983; ROBERTS; BOLTON, 1945) e após o parto (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; JONES et al., 1983;). Um surto da doença afetaria até 50% de rebanho exposto (JONES et al., 1983).

Vários estudos com ovinos e caprinos mostram que *M. agalactiae*, *M. arginini*, *M. capricolum*, *M. mycoides mycoides* LC, *A. laidlawii* e espécies de *Ureaplasma* podem ser isolados do trato genital de espécimes animais mostrando um impacto em potencial de perdas devido infecções genitais (BALL; MCCAUGHEY, 1982; COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; JONES et al., 1983; LIVINGSTONE; GAUER, 1983; RAJYAN; MOHANTY, 1974; SINGH; DOIG; RUHNKE, 1977; TRICHARD et al., 1993).

Embora a etiologia da doença não está definida foi isolado Mollicutes de ovelhas e carneiros sadios (36%) e com lesões de vulvovaginite e balanopostite (83%) naturalmente infectados e de animais experimentalmente infectados que reproduziram a doença com sinais menos brandos (TRICHARD et al., 1993).

Existem indícios que o *Mycoplasma mycoides mycoides* LC (*Mmm*LC) pode ser o principal causador de lesões de balanopostite e vulvovaginite ulcerativa em ovinos da raça Dorper na África do Sul (KINADEMARIAM, 2003; TRICHARD et al., 1993). Apesar disso a literatura não tem revelado qualquer referência ao papel de *Mmm*LC como o agente exclusivo da doença mas surgem evidências de que ele possui um papel importante nessa afecção dos ovinos, nos mostrando que essa espécie não ocorre exclusivamente em caprinos como era pensado (DAMASSA; BROOKS; ADLER, 1983). Em caprinos Rodriguez et al., 1995 relatou o isolamento do *Mmm*LC de dois fetos naturalmente abortados de um rebanho que apresentava alta mortalidade neonatal e aborto que geralmente ocorriam no terço final da gestação. Esse período que ocorre o abortamento é mais comum em cabras e raro em ovelhas, em geral as fêmeas que abortam excretam o microorganismo no leite, no líquido amniótico e na placenta. O microorganismo também pode ser encontrado em cotilédones, fígado e baço dos fetos (PUGH, 2005).

Embora *Mycoplasma espécie 2D* ou *Mycoplasma sorogrupo 11* tenha sido isolado de ovelhas com problemas reprodutivos (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; LIVINGSTONE; GAUER, 1983, NICHOLAS et al., 1999), isolamentos também ocorreram em rebanhos aparentemente normais não tendo como estabelecer o papel etiológico dessa espécie (KAPOOR; SINGH; PATHAK, 1984; LIVINGSTONE; GAUER, 1983) isso foi demonstrado no relato de Livingston e Gauer (1983) que isolou esse Micoplasma de 4 rebanhos do Texas, Estados Unidos, sendo que 2 com problemas reprodutivos e 2 sadios. Em caprinos, Rana, Gupta e Banga (1993), inocularam experimentalmente *Mycoplasma sorogrupo 11* e observaram lesões severas de vulvovaginite granular, caracterizada pela presença de nódulos brancos e edema de mucosa vaginal, cervicite linfática, endometrite e leve ooforite após

exames clínicos e histológicos, concluindo que ele foi patológico para o trato genital caprino.

Microscopicamente, os trabalhos basicamente relatam presença de descamação, degeneração hidrópica e presença de poucos linfócitos e neutrófilos na mucosa do epitélio vulvovaginal, lâmina própria com infiltrados difusos com linfócitos e células plasmáticas com presença de folículos linfóides. Os capilares adjacentes aos agregados linfóides se tornam congestionados e dilatados e na maioria dos casos a porção anterior da vagina e do útero possuem infiltrado de linfócitos subepitelial e células plasmáticas (GIL et al., 2003; RANA; GUPTA; BANGA, 1993; SINGH; RAJYA; MOHANTY, 1974,1975).

No entanto inoculações experimentais desses organismos não reproduziram completamente a doença, existem apenas fortes evidências que sugestionam o envolvimento do *Mycoplasma 2D* e *MmmLC* com surtos de vulvovaginite em ovinos na Austrália (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974) e no Estados Unidos da América (LIVINGSTONE; GAUER, 1983). *Mycoplasma mycoides subespécie mycoides* tem sido isolado de colostro, leite com mastite, fetos abortados e líquido amniótico em caprinos (DAMASSA; BROOKS; ADLER, 1983). Um surto de vulvovaginite e balanopostite foi descrito em um rebanho ovino na Inglaterra (JONES, 1983).

Além de ser um dos responsáveis pela Síndrome de Agalactasia Contagiosa em ovinos e caprinos o *Mycoplasma agalactiae*, está relacionado com casos espontâneos de vulvovaginite granular (GIL et al., 2003; PUGH, 2005; SINGH; RAJYA; MOHANTY, 1974) e experimentais em cabras com lesões características de grânulos do tamanho de “cabeça de alfinete” amarelo-esbraquiçado e translúcido dispostos de forma linear próximo ao clítoris, hiperemia de mucosa e edema além da

presença de exsudato purulento (SINGH; RAJYA; MOHANTY, 1974,1975) e em carneiros infectados experimentalmente pode-se isolá-lo no sangue, sêmen, vesícula seminal, testículos e epidídimos, observando mudanças nas características dos ejaculados e alterações degenerativas nos órgãos necropsiados (AK et al., 1995).

2.4.2 *Ureaplasma* spp.

Desde o primeiro relato de doença urogenital em ovinos associado com *Ureaplasma* (DOIG; RUHNKE, 1977), houveram muitos outros relatos similares em outras partes do mundo (JONES et al., 1983; MCCAUGHEY; BALL, 1981; MCCAUGHEY; BALL; IRWIN, 1979). *Ureaplasma* foi isolado em espojas vaginais para sincronização de cio na Irlanda do Norte de ovelhas normais (MCCAUGHEY; BALL; IRWIN, 1979) e no mesmo país associado a vulvite e vaginite com ulceração no vestíbulo em alguns casos de transmissão experimental (BALL; MCCAUGHEY, 1982).

Embora exista um alto índice de isolados de *Ureaplasma* em trato genital de ovelhas clinicamente normais (JONES; RAE, 1979; LIVINGSTONE JR.; GAUER, 1975; MCCAUGHEY; BALL, 1981; MCCAUGHEY; BALL; IRWIN; 1979), vários sorotipos tem se demonstrado associado com doenças de ovinos (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; LIVINGSTONE JR.; GAUER, 1982) esses diferentes sorotipos podem estar associados as diferentes características que se apresentam os animais de onde eles foram isolados, sendo assim apenas alguns sorotipos podem estar envolvidos com infecção uterina permitindo a reprodução experimental

da doença (JONES; RAE, 1979). Somente em 2004 foi relatado o primeiro isolamento de *Ureaplasma* em sêmen e zaragatoa vaginal de ovinos no estado de São Paulo (GREGORY et al., 2004).

Livingston Junior e Gauer, 1978 isolaram de rebanhos do Texas 9 sorotipos diferentes, acreditando que o sorotipo IX esteja relacionado com os casos de infertilidade. A reprodução experimental da doença demonstrou sinais de resposta inflamatória com hiperemia e edema na região do vestíbulo e vulva passageira que pode ser justificada pela utilização de animais adultos que podem ter sofrido uma infecção natural prévia obtendo uma certa imunidade (BALL; MCCAUGHEY, 1982) enquanto no experimento realizado com ovelhas virgens se observou um período de persistência no trato reprodutivo maior (BALL; MCCAUGHEY; IRWIN, 1984).

Trabalhos demonstrando a transmissão venérea observaram queda na taxa de natalidade dos animais acometidos (BALL; MCCAUGHEY; IRWIN, 1984) morte neonatal devido nascimento de cordeiros fracos e repetição de cio, que pode ser justificado com a hipótese de o *Ureaplasma* causar perdas reprodutivas na concepção, durante as fases iniciais da prenhes, devido a morte do óvulo no momento de sua implantação no útero ou interferindo no desenvolvimento normal do feto (LIVINGSTONE JR.; GAUER, 1982). Além disso a infecção por *Ureaplasma* pode resultar em placentite, porém o abortamento não é um sinal clínico predominante em surtos da doença (PUGH, 2005).

O primeiro relato de vulvite granular sugestionou que certas cepas de *Ureaplasma* estavam associadas com doenças (DOIG; RUHNKE, 1977). *Ureaplasma* tem sido transmitido para ovelhas através da monta natural de carneiros infectados (LIVINGSTONE JR.; GAUER, 1982). Além disso a habilidade dos *Ureaplasmas* induzirem doença genital tem sido confirmado por inoculações

artificiais de cepas de Ureaplasmas, isolados de ovelhas com vulvites, em ovelhas saudáveis com resultado de moderada granularidade e hiperemia na vulva (BALL; MCCAUGHEY, 1982; DOIG; RUHNKE, 1977). McCaughey e Ball (1981) observaram uma significativa incidência de isolamentos de Ureaplasma na região vestibular da vulva.

Estudos com Ureaplasma também mostraram que a infecção ocorre mais frequentemente em ovelhas idosas. Estas fêmeas permanecem como portadores por longos períodos após a infecção primária, e por esta razão quando ocorre uma reinfecção a vulvite observada possui um grau moderado devido a imunidade já adquirida, que é o resultado da infecção prévia (MCCAUGHEY; BALL, 1981). A prevalência de Micoplasmas e Ureaplasmas genitais é relacionado ao tempo que os animais são mantidos no rebanho (LANGFORD, 1975). Ao observar ovelhas que eliminaram Ureaplasma após tratamento e se reinfectaram sem a presença de carneiro entre elas McCaughey e Ball, (1983), sugeriram após isolar Ureaplasma da região peri-anal de um dos animais que essa região poderia servir como reservatório.

Alguns autores citam que o aumento de isolados de Ureaplasma em um rebanho está relacionado com fases de estresse que o animal é submetido como, estresse físico, tratamentos de sincronização de cio e parto (LIVINGSTONE JR.; GAUER, 1982; MCCAUGHEY; BALL, 1979). McCaughey e Ball (1985) compararam as alterações fisiológicas do estro com as causadas por Ureaplasmas genitais e observaram que as ovelhas naturalmente infectadas tiveram um lábio vulvar significativamente mais avermelhado e edemaciado que as não infectadas, sugerindo que Ureaplasma tem influência nessa aparência da vulva. A diferença entre o edema e Eritema vulvar entre animais infectados e não infectados

embora estatisticamente significativa ainda não é fator marcante para o diagnóstico da vulvovaginite por *Ureaplasma*, segundo o referido o autor.

2.4.3 *Acholeplasma* spp.

No caso do *Acholeplasma* spp., sua patogenia ainda não é definitivamente confirmada. Tiwana e Singh (1982) relataram o isolamento de *Acholeplasma oculi* de material obtido do canal vulvovaginal e útero de 22 ovelhas com lesões de vulvovaginite e Jones et al. (1983) isolaram *Acholeplasma axanthum* de 3 das 4 amostras de zaragatoa vaginal positivas para *Mycoplasma capricolum*. Gupta et al. (1990), após inoculação experimental de *Acholeplasma laidlawii* em cabras concluiu que esse organismo é patogênico para o trato genital de caprinos causando vulvite, vaginite, cervicite e vulvite. Enquanto Kapoor, Singh e Pathak (1984) encontraram um alto índice de isolados em animais saudáveis, considerando-o da flora saprófita de ovinos assim com Jones e Rae (1979).

2.5 EXAMES LABORATORIAIS

Atualmente, a Organização Internacional de Micoplasmologia recomenda o uso de dois métodos para a detecção de micoplasmas em amostras clínicas: o cultivo e a PCR.

A especificidade dos micoplasmas pelos seus hospedeiros explica em parte a necessidade do uso de meios de cultura mais complexos, exigindo uma maior diversidade nutricional, que dificulta o cultivo. Estes meios necessitam de soro animal, que fornece ácidos graxos e colesterol para a síntese de membrana dos micoplasmas. A necessidade do colesterol é única entre os procariontes (RAZIN, 1995).

O diagnóstico laboratorial rápido e específico é necessário para monitorar efetivamente as doenças causadas por micoplasmas. A detecção de micoplasmas é baseada, principalmente, no isolamento de seu material biológico com subsequente identificação, baseados inicialmente na fermentação de glicose, hidrólise de arginina e uréia, formação de filmes e manchas, entre outros, e, finalmente, por métodos sorológicos, como a inibição de crescimento e a imunofluorescência (GOLL, 1994).

Embora possamos adicionar antibióticos, tais como as penicilinas ou cefalosporinas, antifúngicos e outros agentes químicos em concentrações maiores para a colheita de amostras clínicas, estes procedimentos se mostram ainda ineficientes diante do alto número de contaminantes presentes nas amostras. Outra causa que limita o isolamento dos micoplasmas é o fato de que estes são organismos frágeis e susceptíveis, conseqüentemente, o material clínico deve ser transportado refrigerado, em meios de transporte adequados ou mesmo no próprio meio de cultura, a amostra deve ser inoculada o quanto antes, não ultrapassando 24 horas após a colheita, mesmo sendo mantida sob refrigeração (METTIFOGO, 2003)

As técnicas de diagnóstico molecular são usualmente indicadas para organismos que crescem lentamente *in vitro* ou que requerem um meio de cultura complexo ou culturas celulares. No caso dos Mollicutes, o cultivo *in vitro* requer um meio de cultura complexo, dispendioso e, em muitos casos, o crescimento é

extremamente lento. Seria necessário ampliar o uso da metodologia molecular no diagnóstico de micoplasmas, para minimizar a necessidade do seu cultivo (RAZIN et al., 1987)

A tecnologia de hibridação de DNA tem sido aplicada com êxito para detectar patógenos fastidiosos de importância veterinária, não sendo ainda aplicada em rotina de diagnóstico devido à sua complexidade e inviabilidade econômica. A técnica da PCR possui ampla aplicabilidade na rotina diagnóstica, por ser mais específica e sensível (BUZINHANI, 2001). A PCR consiste em uma reação *in vitro* utilizada para copiar fragmentos específicos de DNA, constituída basicamente por ciclos de variação térmica promovendo a denaturação, anelamento e extensão do DNA alvo. Ao final do processo, são geradas milhões de cópias da seqüência desejada. Estes processos são dependentes da participação de enzimas específicas (DNA polimerase), além de seqüências de DNA iniciadoras para a replicação (“primers”).

Desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), a PCR é uma técnica útil nos diferentes campos da biologia molecular, como a amplificação e seqüenciamento de DNA em estudos de filogenia, clonagem de expressão gênica, bem como a detecção de agentes infecciosos (HIRATA, 1997).

A sensibilidade observada na PCR é importantíssima para a detecção de agentes em amostras clínicas provenientes de animais assintomáticos ou sob tratamento com antibióticos. Além disso, é possível detectar um organismo patogênico antes que este induza uma resposta imunológica ou em hospedeiros imuno comprometidos, demonstrando também vantagens sobre os testes sorológicos (KEMPF, 1998)

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) avaliar a presença das *Mycoplasma* spp. em ovinos criados na região de Piedade, Estado de São Paulo (*Mycoplasma* sp, *Ureaplasma* spp. e *Acholeplasma laidlawii*) no trato reprodutivo das fêmeas ovinas;*

- b) relacionar a presença destes microorganismos com alterações do sistema reprodutivo;*

- c) estabelecimento da possível correlação entre os tipos de lesões macroscópicas no aparelho genital de fêmeas ovinas com os diferentes Mollicutes;*

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS UTILIZADOS E CATEGORIZAÇÃO AMOSTRAL

Foram estudadas 60 fêmeas da espécie ovina pertencente a 5 rebanhos de propriedades localizadas na região de Piedade no Estado de São Paulo. As propriedades foram escolhidas aleatoriamente dentre as que fazem parte da União de criadores de ovinos e caprinos de Piedade e região. Para verificação da possível transmissão sexual de micoplasmas colheu-se material de uma fêmea coberta por um único macho, sabidamente positivo. Para a avaliação da técnica diagnóstica utilizou-se 17 animais dentro do projeto piloto.

Os animais utilizados para colheita de material foram selecionados de acordo com o exame clínico geral os que nunca apresentaram disfunções reprodutivas e o outro grupo em que alguma vez em sua vida reprodutiva já haviam apresentado disfunções reprodutivas inespecíficas como: infertilidade, repetição de cio, endometrites, abortos, nascimento de cordeiros fracos, morte neonatal dentre outras. Outro fator para colheita de material é a de que as fêmeas tivessem parido pelo menos uma vez.

O material clínico selecionado para analisar foi muco vulvovaginal obtido através de colheita por zaragatoa.

4.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Anteriormente a colheita do material clínico, as fêmeas selecionadas foram submetidas a higiene da região externa da vulva com papel toalha descartável. Para obtenção do material clínico a vulva era aberta com deslocamento dos lábios vulvares e através da utilização do espéculo vaginal tipo bico de pato friccionava-se a zaragatoa na região vestibulo-vaginal. O espéculo era previamente higienizado a cada nova colheita com solução de iodo polvidine e posteriormente era flambado e resfriado com solução fisiológica. As colheitas eram realizadas em duplicatas. Imediatamente após a fricção da zaragatoa o mesmo era transferido para tubos coletores contendo meio de transporte SP4 para *Mycoplasma spp.* e outro U_B para *Ureaplasma spp.* e mantido sob refrigeração em isopores até o momento do processamento laboratorial. As amostras eram processadas até 24 horas após a colheita.

4.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

Os animais foram examinados individualmente e realizava-se o exame específico do aparelho genital através da inspeção direta externa da vulva e vestibulo da vagina, e inspeção indireta do fundo da vagina e entrada da cérvix através do auxílio do espéculo e lanterna para melhor visualização de lesões características de

vulvovaginite ou outras alterações que foram registradas em uma ficha clínica (Figura 1) que continha as seguintes observações:

- Em relação a vulva observações sobre o tamanho, assimetria de vulvar, posição, cicatriz, traumas, pigmentação da pele, mucosa hipocorada ou hipercorada, edema, presença de corrimento, e se houvesse a presença desse avaliava-se a coloração do muco, quantidade, consistência, aspecto e odor;
- No exame da vagina com o auxílio do espécúlo era observado se havia a presença de traumas, lesões granulosas, nódulos, petéquias, pústulas, telangectasia, eritema, mucosas hipocorada ou hipercorada, urovagina, presença de sangue e catarro genital, e esse se presente observava-se coloração, quantidade, consistência, aspecto e odor;
- Na cérvix ainda com o auxílio do espécúlo observava-se à coloração da mucosa que poderia ser classificada de quatro tipos: esbranquiçada, rósea-clara, rósea, e avermelhada. Era observado também o formato da cérvix, coloração, abertura do orifício, umidade e se havia presença de catarro genital ou não.
- Além do exame específico do trato reprodutivo era realizado avaliação geral dos outro aparelhos, digestório, locomotor, respiratório, urinário, glândula mamária, pele e anexos e estado nutricional dos animais que era observado através do escore corporal.
- Além dos dados obtidos no exame clínico, foi obtido através de anamnese informações sobre o histórico reprodutivo desses animais como: número de partos, data do último parto, intervalo entre partos, se já havia ocorrido casos de aborto, prolapso, retenção de secundinas, parto distócico, parto prematuro e morte neonatal.

Os animais ainda foram divididos em dois grupos quanto a sua idade, j ovens animais com idade abaixo de 2 anos e adultos acima de 2 anos.

Data Coleta:	Propriedade:	
Nome:	Idade:	Raça:

Exame da Vulva

Tamanho reduzido		Corrimento:
Assimetria lábios		Vulva – Calda - Membros
Posição		Cor:
Trauma\Cicatriz		Odor:
Pigmentação Pele		Consistência:
Edema		OBS:
Outros		

Exame da Vagina

Traumas		Catarro genital:
Lesão Granulomatosa		Cor:
Telangiectasia		
Nódulos		Odor:
Petéquias		Quantidade (1 a 5):
Eritema		Aspecto:
Pústulas		OBS:
Fezes\Urovagina		

Cérvix

Coloração:		Catarro genital:
Esbranquiçada	Rósea-clara	Cor:
Rósea	Avermelhada	Aspecto:
() Aberta	- () Fechada	Odor:
Muco:		OBS:

Palpação Abdominal

Dor: () Sim () Não	Aumento de Volume: () Sim () Não
Consistência:	OBS:

Histórico Reprodutivo

Data de Aquisição:		Parto Prematuro: () Sim () Não
N de Partos:		Estado geral dos neonatos:
Estado Reprodutivo:	() Parto () Anestro () Estro () Prenhez	
Data último parto:		Morte neonatal: () Sim () Não
Aborto	() Sim () Não	Número:
Número :		Idade:
Período da gestação:		Intervalo entre partos:
Prolapso:	() Sim () Não	Retenção de placenta: () Sim () Não
Parto distócico:	() Sim () Não	OBS:

Exame Clínico Geral

Escore Corporal	
Pele e Anexos	
Ap. Respiratório	
Ap. Digestório	
Ap. Urinário	
Ap. Locomotor	
Glândula Mamária	

Figura 1 – Ficha de exame clínico

4.4 ANÁLISE LABORATORIAL

A análise laboratorial foi realizada através de cultivo bacteriano e reação de cadeia em polimerase (PCR) no caso de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. e somente reação de cadeia em polimerase (PCR) no caso do *Acholeplasma laidlawii*.

4.4.1 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo foram preparados de acordo com os protocolos abaixo.

4.4.2 Meios Líquido/ Sólido SP4 (TULLY, 1995)

- Triptona (Oxoid).....10,0 gr.
- Peptona (Oxiod).....5,3 gr.
- Mycoplasma Broth base (becton Dickinson) 3,5gr.
- H₂O.....750 mL

O pH foi ajustado em 7,8.

Adicionar 10 gramas (gr.) de ágar purificado (Oxoid) para preparar meio sólido.
Autoclavar a 121°C por 20 minutos (min.);

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

- Soro eqüino (Cultilab).....180 mL
- CRML 1066 (Gibco).....50 mL
- Extrato fresco de levedura 25%.....35 mL
- Glicose 10% (Merck).....10 mL
- Arginina 10% (Merck).....1 mL
- *Yeastolate* (Difco).....10 mL
- Vermelho de Fenol 0,5% (Merck).....4 mL
- Penicilina 100 000 U/mL (Sigma).....1 mL
- Acetato de tálio 1% (Sigma).....10 mL

Realizar teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

4.4.3 Meios Líquido U_B (RUHNKE; ROSENDAL, 1994)

- PPLO (Difco).....21,0 gr.
- H₂O destilada.....630 mL

O pH foi ajustado em 6,0.

Autoclavar a 121°C por 20 min;

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

- Soro eqüino (Cultilab).....200 mL
- Extrato fresco de levedura 25%.....100 mL
- Uréia 10% (Sigma).....10 mL
- Penicilina 100 000 U/mL (Sigma).....5 mL
- CRML 1066 (Gibco).....50 mL
- L-cisteína 2% (Merck).....10 mL
- Vermelho de Fenol 0,5% (Merck).....4 mL
- Anfotericina B (Sigma).....200µL

Realizar teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

4.4.4 Meios Sólido U_B (RUHNKE & ROSENDAL, 1994)

- TSB (Difco).....21,0 gr.
- H₂O.....600 mL
- Ágar (Noble-Oxoid)15gr.

O pH foi ajustado em 5,5.

Autoclavar a 121°C por 20 min.

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

- Soro eqüino (Cultilab).....	200 mL
- Extrato fresco de levedura 25%.....	100 mL
- Uréia 10% (Sigma).....	10 mL
- Penicilina 100 000 U/mL (Sigma).....	5 mL
- MnSO ₄ 3% (Merck).....	5 mL
- Vermelho de Fenol 0,5% (Merck).....	4 mL
- CRML 1066 (Gibco).....	50 mL
- Anfotericina B (Sigma).....	200µL

Realizar teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

4.4.5 *Subcultivo de Amostras de Referência de Micoplasma*

As amostras de referência de micoplasmas, estocadas previamente em caldo e glicerol a -20°C, eram subcultivadas em meios específicos SP4 a 37°C em atmosfera de microaerofilia.

4.4.6 *Cultivo de Micoplasma de Amostras Clínicas*

O material clínico foi processado, no máximo, após 24 horas da colheita. O caldo SP4 e U_B utilizados como transporte, contendo a zaragatoa, foram homogeneizados e submetidos a três diluições decimais nos meios específicos. Destas amostras, a própria zaragatoa e 50 µL das diluições 10⁻³ foram utilizados diretamente na

semeadura em placa de ágar SP4 e U_B. Os meios líquidos e sólidos foram incubados a 37°C, sendo as placas com ágar SP4 incubadas em condições de microaerofilia e observadas por 15 dias consecutivos.

Os Micoplasmas foram caracterizados inicialmente pela produção de colônias em forma de “ovo frito” e por suas bases metabólicas, como a utilização de glicose e/ou arginina evidenciada pela alteração de pH e formação de filmes e manchas (RAZIN; TULLY, 1983).

Os Ureaplasmas foram caracterizados pela visualização do aumento do pH no meio de cultura devido à utilização da uréia e pela presença de pequenas colônias granulosas e de coloração marrom escuro no ágar, devido à precipitação de cátions de manganês pela atividade da urease (RUHNKE; ROSENDAL, 1994).

4.4.7 Método de Extração de DNA

Todas as amostras colhidas foram realizadas o teste de PCR de acordo com os métodos abaixo descritos.

4.4.8 Extração do DNA das Cepas de Referência e Amostras Clínicas

Culturas positivas das cepas de referência (20 mL) e material clínico (1 mL) foram submetidas à extração por fervura descrito por Fan, Kleven e Jackwood

(1995). Foi realizada centrifugação a 13000 rpm por 10 min., e duas lavagens do sedimento com 100 µL de PBS (2,6 mM NaH₂PO₄; 7,4 mM NaHPO₄; 14 mM NaCl; pH 7,2). O sedimento obtido foi ressuspenso em 20 µL de PBS, fervido em “banho maria” por 10 min., acondicionado imediatamente em gelo por 5 min. e submetido a nova centrifugação a 13.000 rpm por 10 min.. O sobrenadante foi estocado a - 20°C até a sua utilização.

4.4.9 *Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*

A execução da PCR foi realizada em salas separadas para a preparação das reações, manipulações das amostras de DNA e corrida eletroforética. Trocas de luvas foram realizadas a cada entrada e saída das áreas isoladas. Os reagentes da PCR foram divididos em alíquotas e estocados em área livre de produtos amplificados (HIRATA, 1997; KWOK; HIGUCHI, 1989). A cada amplificação foram adicionados um controle positivo (cepa de referência) e um controle negativo (água ultrapura).

4.4.10 *Ligonucleotídeos Iniciadores (primers) Genéricos*

Os *primers* genérico utilizados são complementares a seqüências conservadas do gene 16S do rRNA para a Classe dos *Mollicutes* (Mycoplasma, Acholeplasma,

Ureaplasma e Spiroplasma), descrito por Van Kuppeveld et al. (1992). Os *primers* GPO3 e MGSO são complementares, respectivamente, às regiões V2 e V7 e estão nas posições 789 – 5' e 1055- 3'.

Tabela 1 - Primers GPO3 e MGSO das regiões V2 e V7 do micoplasma genérico

Iniciadores	Seqüência	Produto
GPO3	5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATAC CCT-3'	
MGSO	5'- TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'	270pb

Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado a um microtubo (0,2 mL) 50 pmol de cada *primer*, 2 U de *Taq* DNA polimerase, 2,0 mM de MgCl₂, 100 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 5 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador (PCR Express Thermal Cycler – Thermo Hybaid) programado para um ciclo de 94°C durante cinco min, 35 ciclos de 94°C durante 30s, 55°C durante 30s, 72°C durante 30s. e um ciclo final de 72°C por 10 min.

4.4.11 Oligonucleotídeos Iniciadores (*primers*) para o Gênero *Ureaplasma*

Os *primers* para a detecção do gênero *Ureaplasma* que foram utilizados são complementares a seqüência conservada do gene 16S do rRNA (LAUERMAN, 1998).

Tabela 2 - Primers UGPF e UGPR das regiões conservadas do gênero *Ureaplasma*.

Iniciadores	Seqüência	Produto	Localização
UGPF	5'-GGATGAGGGTGCGACGTATC-3'		237– 256
UGPR	5'-GCGTTAGCTACAACACCGAC -3'	644 pb	862 – 881

Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado a um microtubo (0,2 mL) 20 pmol de cada *primer*, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, 2,0 mM de MgCl₂, 50 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 5 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: 40 ciclos a 94°C durante 30s, 55°C durante 30s, 72°C durante 60s. e um ciclo final de 72°C por cinco min.

4.4.12 PCR espécie-específica

O PCR para *Acholeplasma laidlawii* foi realizado de acordo com as técnicas descritas abaixo.

4.4.13 *Acholeplasma laidlawii*

Os *primers* utilizados são complementares à seqüência do gene 16S do rRNA específica para *A. laidlawii* (descritos por DUSSURGETT; DUSOIX, 1994).

Tabela 3 - Primers UNI- e ACH3 para identificação de *Acholeplasma laidlawii*

Primers	Seqüência	Produto	Localização
UNI-	5'- TAATCCTGTTTGCTCCCCAC-3'	505 pb	763 – 782
ACH3	5'-AGCCGGACTGAGAGGTCTAC-3'		277 – 296

Para a reação em cadeia da polimerase será adicionado a um microtubo (0,2 mL) 40 pmol de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase, 1,2 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 1 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação será realizada em termociclador programado para: um ciclo de 95°C por 5 min., 30 ciclos de 95°C por 30 s., 64°C por 1,5 min., 72°C por 1,5 min. e um ciclo final de 72°C por 10 min.

4.4.14 Detecção do Produto Amplificado

Os produtos da PCR (10µL) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 10 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2 mM EDTA, pH 8,0). A visualização e fotodocumentação dos produtos foram realizadas sob luz ultravioleta. O marcador de peso molecular utilizado será 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Este procedimento foi empregado em todas as análises dos produtos da PCR.

4.5 ESTATÍSTICA

Em princípio, os resultados foram submetidos à análise de variância, sendo o contraste entre médias analisado pelo Teste χ^2 em amostras paramétricas e teste de Fischer em amostras não paramétricas, com níveis de significância igual a 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

O presente estudo das micoplasmoses em ovinos, desenvolvido na região de Piedade em propriedades da Associação do Criadores de Ovinos e Caprinos da região do estado de São Paulo, teve a duração de aproximadamente 2 anos.

5.1. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Os resultados encontrados nesta pesquisa no cultivo e no PCR estão dispostos em 27 tabelas e 11 figuras.

5.1.1. *Cultivo das Amostras de Muco Vulvovaginal para Detecção de Micoplasma*

Nas culturas realizadas em meio SP4 para o isolamento de *Mycoplasma sp* de 18 amostras que não contaminaram 6 resultaram positivas (33,3%). Estes isolados apresentaram-se como colônias em forma de “ovo-frito” no ágar SP4 e não apresentaram formação de filmes e manchas (Figuras 2 e 3). *Mycoplasma sp* foi isolado em trato genital de fêmea ovina pela primeira vez no Brasil.

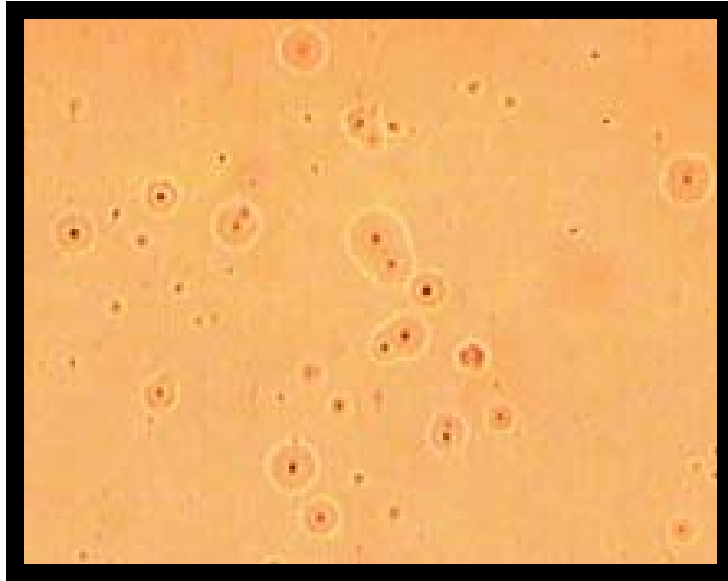


Figura 2 - Cultivo de muco vulvovaginal de ovinos em meio SP4 apresentando crescimento de *Mycoplasma* spp. (X 40)



Figura 3 - Cultivo de muco vulvovaginal de ovinos em meio SP4 apresentando crescimento de *Mycoplasma* spp. (X40, X100 e X400)

5.1.2. Cultivo das Amostras de Muco Vulvovaginal para Detecção de Ureaplasmas

Nas culturas realizadas em meio U_B para o isolamento de *Ureaplasma* spp de 22 amostras, 10 foram positivas (45,5%) foram positivas. Estes isolados apresentaram-se como colônias marrom escuras e granulosas no ágar U_B. (Figuras 4 e 5). O *Ureaplasma* sp foi isolado pela primeira vez em cultura, em trato genital de ovinos no Brasil.

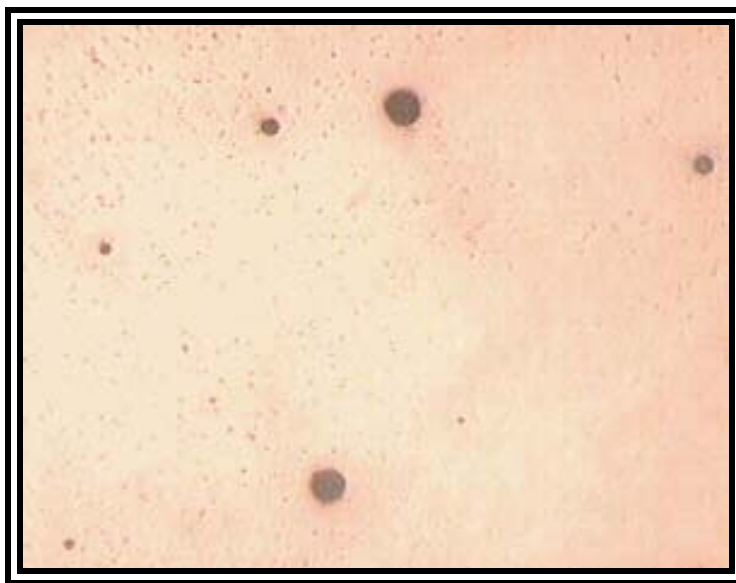


Figura 4 - Cultivo de muco vulvovaginal de ovinos em meio U_B apresentando crescimento de *Ureaplasma* spp. (X40)

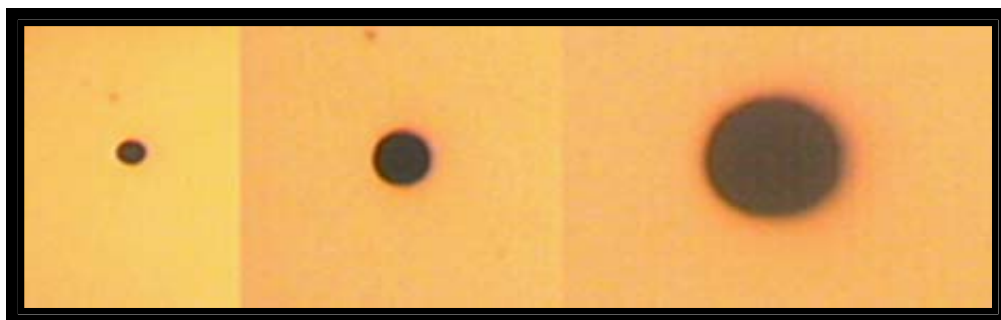


Figura 5 - Cultivo de muco vulvovaginal de ovinos em meio U_B apresentando crescimento de *Ureaplasma* spp. (X40, X100 e X400)

5.1.3 Cultivo das Amostras de Muco Vulvovaginal de Fêmeas Ovinas com Crescimento Associado

Durante o estudo houve crescimento em meio U_B de colônias de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp. associadas (Figura 7). Pela primeira vez no mundo houve o crescimento neste meio dos dois microorganismos associados.

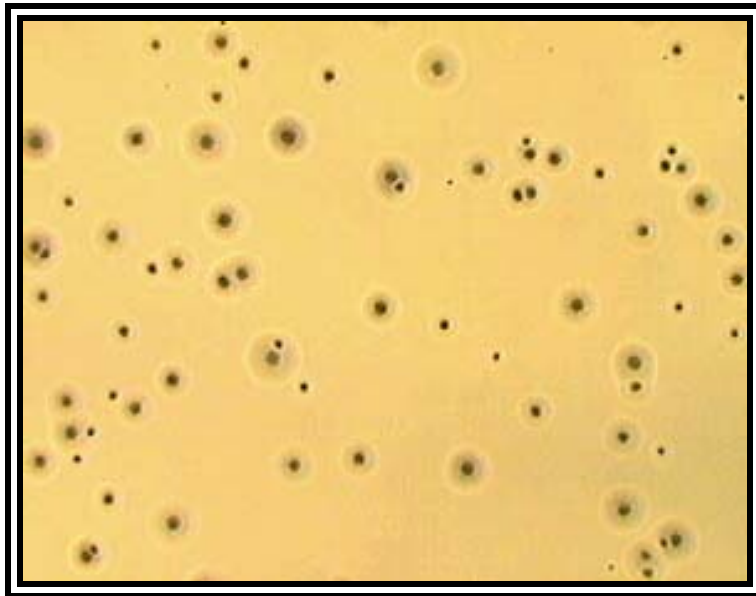


Figura 6 - Cultivo de muco vulvovaginal de fêmea ovina em meio U_B apresentando crescimento de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp. (X40)

5.1.4 *Cultivo das Amostras de Muco Vulvovaginal de Fêmeas Ovinas no mesmo Pasto que Macho Positivo Durante o Projeto Piloto.*

Durante a fase projeto piloto foi isolado de uma fêmea ovina após o coito *Ureaplasma* spp. em meio U_B do sêmen de uma macho positivo (Figura 6), fato que prova a transmissão através da monta natural.

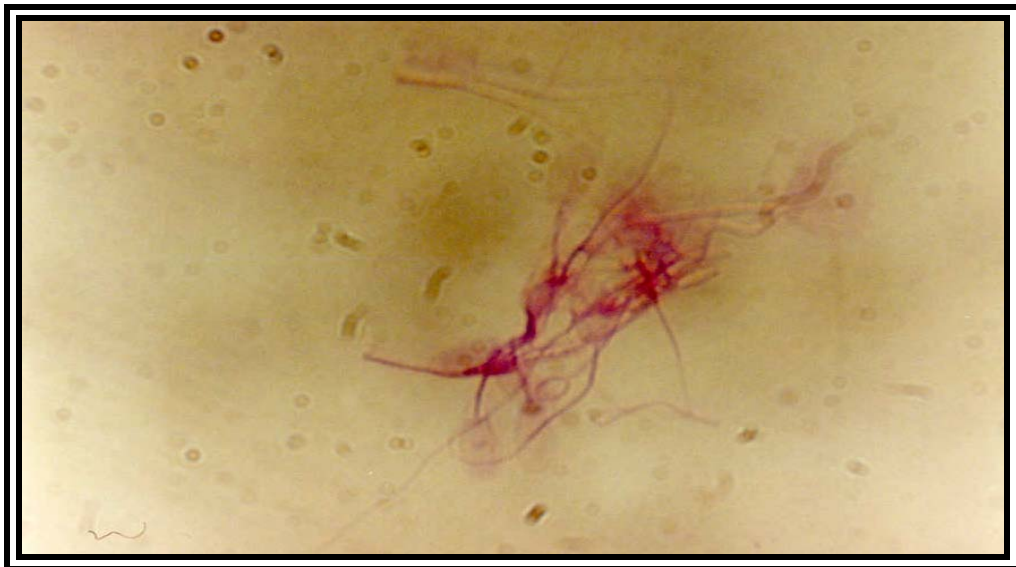


Figura 7 - Cultivo de muco vulvovaginal de fêmea ovina em meio U_B apresentando crescimento de *Ureaplasma* spp. e presença de espermatozóides após a cobertura por macho sabidamente positivo (X40)

5.1.5 Detecção de *Micoplasmas* em Muco Vulvovaginal Ovino por meio da PCR Utilizando Primers Genéricos

O DNA extraído das amostras clínicas colhidas em meios específicos para *Micoplasma* e *Ureaplasma* foram submetidos à PCR com primers genéricos, onde observou-se 45 reações positivas (75%).

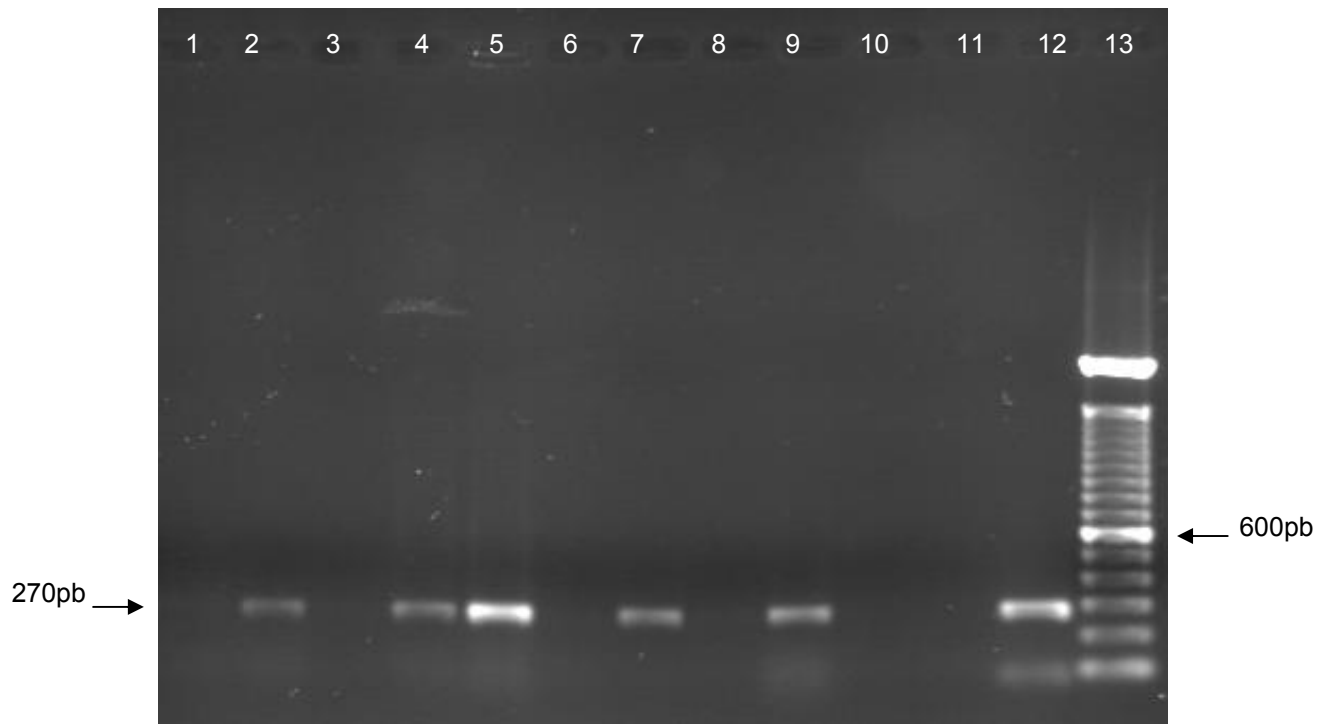


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando “primers” genéricos GPO3/MGSO a partir do DNA de culturas extraído de amostras de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna 01 a 10: amostras muco vulvovaginal sendo positivas as colunas 2, 4, 5, 7 e 9. Coluna 11: controle negativo das reações com água ultra pura. Coluna 12: controle positivo da reação com DNA de *Mycoplasma bovis*. Coluna 13: Coluna 16: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

5.1.6 Detecção de *Ureaplasma* spp. em Muco Vulvovaginal Ovino por meio da Técnica de PCR

O DNA extraído das amostras clínicas colhidas em meios específicos para *Ureaplasma* sp foram submetidos à PCR com primers específicos, onde se observou 40 reações positivas (66,7%).

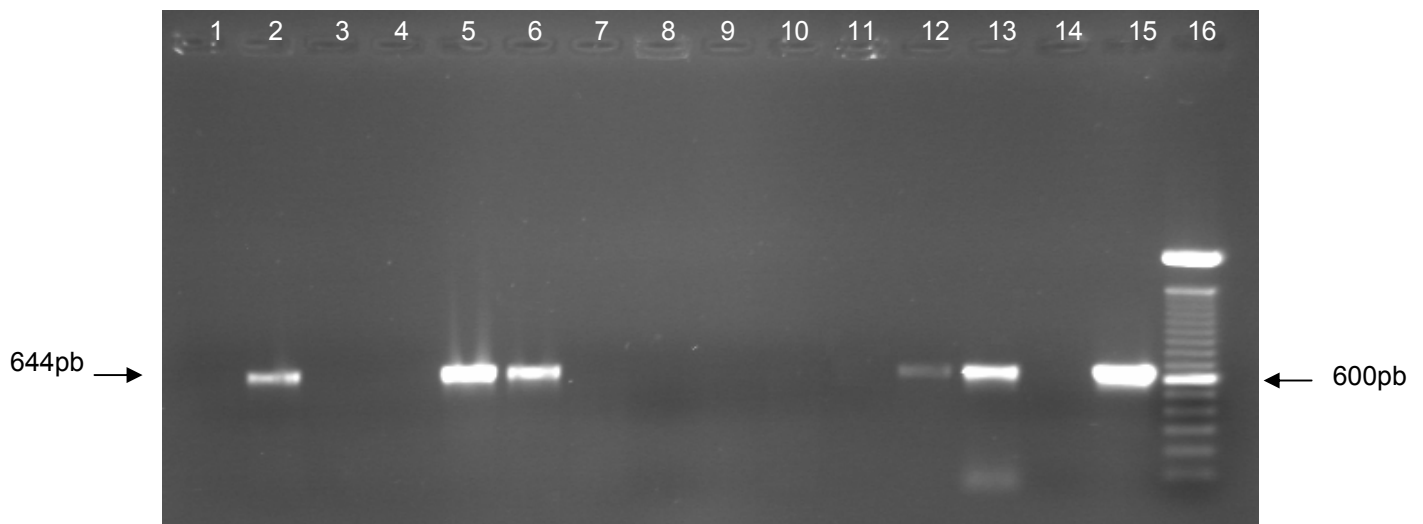


Figura 9 - Amplificação da subunidade 16S rRNA do gênero *Ureaplasma* spp com primers UGPF/UGPR. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR a partir do DNA de culturas extraído de amostras de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna de 1 a 14: amostras muco vulvovaginal sendo positivas as colunas 2, 5, 6, 12 e 13. Coluna 14: controle negativo das reações com água ultra pura.; Coluna 15 controle positivo da reação com DNA do *Ureaplasma diversum* ATCC 49782; Coluna 6: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

5.1.7 Detecção de *Acholeplasma laidlawii* em Muco Vulvovaginal Ovino por meio da Técnica de PCR

O DNA extraído das amostras clínicas colhidas em meios específicos para *Acholeplasma laidlawii* foram submetidos à PCR com primers específico, onde observou-se 1 reações positivas (1,7%).

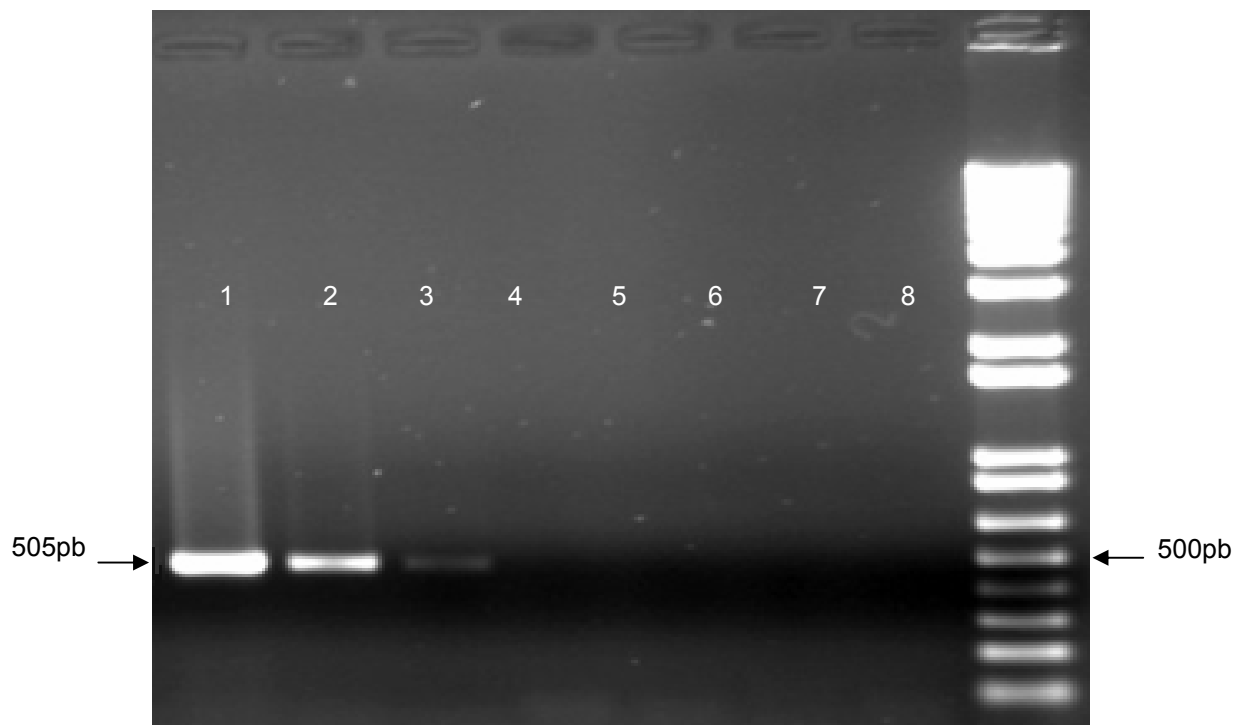


Figura 10 - Amplificação da subunidade 16S rRNA, espécie *Acholeplasma laidlawii*, com primers UNI /ACHA3. Análise de eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR a partir do DNA de culturas extraído de amostras de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna de 1: controle positivo da reação com DNA de *Acholeplasma laidlawii*. Colunas 2 a 6 amostras muco vulvovaginal sendo positivas as colunas 2 e 3. Coluna 7: controle negativo das reações com água ultra pura. Coluna 8: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

5.1.8 Resultados das Frequências de Micoplasmas e dos Sinais Estudados por Meio da Técnica de PCR

Tabela 4 - Frequência de animais positivos e negativos para micoplasmas segundo categorias etárias, São Paulo, 2005

Animais	% (Nº de animais/Total de animais)		P
	Positivos	Negativos	
Jovens	60%(27/45)	60% (9/15)	1.000
Adultos	40%(18/45)	40%(6/15)	-
Total	45	15	-

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Das 60 amostras colhidas de muco vulvovaginal, observa-se na Tabela 1 que 27 animais jovens e 18 dos animais adultos foram positivos através da técnica da PCR para micoplasmas. Ao comparar os dados não se encontrou relação entre a presença ou não de micoplasmas e a idade dos animais.

Tabela 5 - Frequência de alterações na vulva em animais infectados e não infectados por micoplasmas, São Paulo, 2005

Alterações	% (Nº de animais/Total de animais)		P
	Positivos	Negativos	
Assimetria Vulvar	6,7%(3/45)	6,6% (1/15)	1.000
Corrimento	2,2%(1/45)	6,6% (1/15)	0.441
De Posição	2,2% (1/45)	0%(0/15)	1.000
Edema	13,3%(6/45)	6,6% (1/15)	0.668
Hipercorada	4,4%(2/45)	6,6% (1/15)	1.000
Hipocorada	2,2% (1/45)	6,6% (1/15)	0.441
Pigmentação da Pele	33,4%(15/45)	13,3%(2/15)	0.192
Tamanho Reduzido	2,2%(1/45)	6,6% (1/15)	0.441
Trauma	2,2%(1/45)	0%(0/15)	1.000

Valores $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Nas 60 amostras colhidas de acordo com a tabela 2, 45 foram positivas para micoplasmas genérico. Os dados obtidos no exame clínico da vagina foram estatisticamente avaliados comparando-se a presença ou não dos micoplasmas com as lesões estudadas. Não se encontrou associação estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 6 - Frequência de alterações da vagina observadas através da inspeção indireta em animais infectados e não infectados por micoplasmas, São Paulo, 2005

Alterações	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Catarró Genital	13,3%(6/45)	13,3%(2/15)	1.000
Edema	4,4%(2/45)	0%(0/15)	1.000
Eritema	11,1%(5/45)	6,6% (1/15)	1.000
Hiperacorada	24,4%(11/45)	33,3%(5/15)	0.516
Hipocorada	4,4%(2/45)	0%(0/15)	1.000
Lesões Granulosas	48,9%(22/45)	33,3%(5/15)	0.454
Nódulo	0%(0/45)	0%(0/15)	-
Petéquia	4,4%(2/45)	6,6% (1/15)	1.000
Pústula	6,6%(3/45)	0%(0/15)	0.566
Sangue	4,4%(2/45)	0%(0/15)	1.000
Telangectasia	6,6%(3/45)	0%(0/15)	0.566
Trauma	2,2%(1/45)	0%(0/15)	1.000
Urovagina	2,2%(1/45)	6,6% (1/15)	0.441

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

A lesão de maior frequência entre as amostras colhidas foi a lesão granulosa. Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de alterações e condição de positivo para micoplasmas. A segunda lesão de maior frequência encontrada foi a coloração hiperacorada da vagina.

Tabela 7 - Frequência de vulvovaginite em animais infectados e não infectados por micoplasmas, São Paulo, 2005

	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Vulvovaginite	68,9%(31/45)	60,0%(9/15)	0.752

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

A presença de vulvovaginite foi diagnosticada através do exame clínico da região vulvovaginal quando observou-se uma das lesões referidas nos tabelas acima apresentadas (Tabela 5 e 6). Dos 60 animais, 40 foram diagnosticados com vulvovaginite conforme a tabela 7. Não houve associação estatisticamente significativa entre vulvovaginite e condição de positivo para micoplasmas ($p=0.752$).

Tabela 8 - Frequência de alterações no histórico reprodutivo dos animais estudados infectados e não infectados por micoplasmas, São Paulo, 2005

Alterações no Histórico	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Reprodutivo			
Aborto	13,3%(6/45)	0%(0/15)	0.321
Distocia	2,2%(1/45)	6,6%(1/15)	0.441
Fetos Prematuros	0%(0/45)	0%(0/15)	-
Morte Neonatal	15,5%(7/45)	13,3%(2/15)	1.000
Problemas com Neonato	4,4%(2/45)	0%(0/15)	1.000
Prolapso	0%(0/45)	6,6%(1/15)	0.250
Retenção de Secundinas	4,4%(2/45)	0%(0/15)	1.000

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

As informações obtidas no histórico reprodutivo dos animais foram relacionadas com a presença ou não de micoplasmas em busca de associação. As maiores frequências foram de animais que apresentaram morte neonatal e os que

em algum período de sua vida reprodutiva abortaram conforme observado na tabela 5, porém estas manifestações não foram estatisticamente significantes entre animais infectados e não infectados, assim como os animais que apresentaram parto distócico, fetos prematuros, problemas com os neonatos, como nascimento de cordeiros fracos, prolapso vaginal ou uterino e retenção de secundinas.

Tabela 9 - Frequência de alterações nos diversos sistemas e no escore corporal dos animais infectados e não infectados por micoplasmas, São Paulo, 2005

Alterações nos Sistemas e Escore Corporal	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Sistema Digestório	0%(0/45)	0%(0/15)	-
Sistema Locomotor	0%(0/45)	6,6%(1/15)	0.250
Sistema Respiratório	0%(0/45)	0%(0/15)	-
Sistema Urinário	0%(0/45)	0%(0/15)	-
Glândula Mamária	4,4%(2/45)	0% (0/15)	1.000
Pele e Anexos	4,4%(2/45)	6,6%(1/15)	1.000
Escore Corporal <2,5	20%(9/45)	6,6%(1/15)	0.426

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Não foi detectada associação estatisticamente significativa entre as alterações nos sistemas e escore corporal com a condição de positivo para micoplasmas.

5.1.9 Resultados das Frequências de *Mycoplasma* spp. e dos Sinais Estudados por Meio do Cultivo em Placa

Tabela 10 - Frequência de animais positivos para Mycoplasma spp. segundo categorias etárias, São Paulo, 2005

Animais	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Jovens	40%(2/5)	76,9%(10/13)	0.268
Adultos	60%(3/5)	23,1%(3/13)	-
Total	5	13	-

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Das 60 amostras colhidas de muco vulvovaginal apenas 18 foram possíveis de se realizar o diagnóstico através do isolamento para o *Mycoplasma* spp, pois as outras amostras contaminaram. (Vide Tabela 10). Dessas 18 amostras, 5 foram positivas para cultura de *Mycoplasma* spp. sendo 2 animais jovens e 3 animais adultos. Não foi identificada associação estatisticamente significativa entre a idade dos animais e a presença de *Mycoplasma* spp. no muco vulvovaginal.

Tabela 11 - Frequência de alterações na vulva em animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp., São Paulo, 2005

Alterações	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivas	Negativas	
Assimetria Vulvar	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Corrimento	20%(1/5)	7,7%(1/13)	0.490
De Posição	0%(0/5)	7,7%(1/13)	1.000
Edema	40%(2/5)	0%(0/13)	0.065
Hiperêmica	20%(1/5)	0%(0/13)	0.278
Hipocorada	20%(1/5)	7,7%(1/13)	0.490
Pigmentação da Pele	40%(2/5)	23,1%(3/13)	0.583
Tamanho Reduzido	0%(0/5)	7,7%(1/13)	1.000
Trauma	0%(0/5)	0%(0/13)	-

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Das 18 amostras onde foi possível a realização do diagnóstico através da cultura bacteriana, as alterações mais frequentes foram a alteração da pigmentação da pele e edema nos animais positivos (Tabela 11). Corrimento, coloração hiperacorada e coloração hipocorada são outras lesões encontradas nos animais positivos. As demais lesões só estiveram presentes em animais negativos ou não foi detectado em nenhum dos 18 animais. Não houve associação estatisticamente significativa entre as lesões e a presença ou não de *Mycoplasma* spp.

Tabela 12 - Frequência de alterações da vagina em animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp., São Paulo, 2005

Alterações	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Catarro Genital	20%(1/5)	15,4%(2/13)	1.000
Edema	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Eritema	0%(0/5)	15,4%(2/13)	1.000
Hiperacorada	40%(2/5)	15,4%(2/13)	0.533
Hipocorada	20%(1/5)	0%(0/13)	0.278
Lesões Granulosas	60%(3/5)	46,1%(6/13)	1.000
Nódulo	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Petéquia	0%(0/5)	15,4%(2/13)	1.000
Pústula	20%(1/5)	0%(0/13)	0.278
Sangue	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Telangectasia	40%(2/5)	0%(0/13)	0.065
Trauma	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Urovagina	0%(0/5)	7,7%(1/13)	1.000

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

A tabela 12 acima relacionando as 18 amostras de cultivo bacteriano demonstra a presença de alterações na vulva como lesões granulosas, telangectasia, coloração hiperacorada, coloração hipocorada, pústula e presença de

catarro genital, relacionados com a presença ou não de *Mycoplasma* spp. Sendo que estas alterações não estão estatisticamente associadas à condição de positivo. As demais alterações não foram observadas nas 5 amostras diagnosticadas como positivas.

Tabela 13 - Frequência de vulvovaginite em animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp., São Paulo, 2005

	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Vulvovaginite	80%(4/5)	69,2 (9/13)	0.270

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

A presença de vulvovaginite foi diagnosticada no exame clínico da vulva quando observou-se uma das lesões referidas nas Tabelas acima (Tabelas 11 e 12), com isso dos 18 animais, 4 foram diagnosticados com vulvovaginite (Tabela 13) e também foram positivos para *Mycoplasma* spp.. Entre os animais negativos para *Mycoplasma* spp., 4 estavam saudáveis e 9 foram diagnosticados com vulvovaginite. Não foi possível identificar associação entre a presença *Mycoplasma* spp. e vulvovaginite ($p=0.270$).

Tabela 14 - Frequência de alterações do histórico reprodutivo dos animais estudados infectados e não infectados por Mycoplasma spp., São Paulo, 2005

Alterações no Histórico	% (Nº de animais/Total de animais)		P
	Positivos	Negativos	
Reprodutivo			
Aborto	0%(0/5)	15,4%(2/13)	1.000
Distocia	0%(0/5)	7,7%(1/13)	1.000
Fetos Prematuros	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Morte Neonatal	20%(1/5)	23,1%(3/13)	1.000
Problemas com Neonato	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Prolapso	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Retenção de Secundinas	0%(0/5)	0%(0/13)	-

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Entre as 18 amostras apenas 1 apresentou histórico de problema reprodutivo, morte neonatal, e não foi identificada associação estatisticamente significativa entre condição de positivo e alterações no histórico reprodutivo (Vide Tabela 14). As demais alterações não foram observadas nos animais positivos.

Tabela 15 - Frequência de alterações nos diversos sistemas e no escore corporal dos animais infectados e não infectados por Mycoplasma spp., São Paulo, 2005

Alterações nos Sistemas e Escore Corporal	%(Nº de animais/Total de animais)		P
	Positivos	Negativos	
Sistema Digestório	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Sistema Locomotor	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Sistema Respiratório	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Sistema Urinário	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Glândula Mamaria	0%(0/5)	0%(0/13)	-
Pele e Anexos	0%(0/5)	15,4%(2/13)	1.000
Escore Corporal < 2,5	40%(2/5)	7,7%(1/13)	0.172

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Nas 18 amostras onde foi possível o diagnóstico através do isolamento bacteriano observou-se alteração no escore corporal de 3 animais sendo que 2 destes eram positivos para *Mycoplasma* spp. conforme tabela 15. Na avaliação estatística destes casos o valor de p foi igual a 0.172, não significativa.

5.1.10 Resultados das Freqüências de *Ureaplasma* spp. e dos Sinais Estudados por Meio da Técnica de PCR

Tabela 16 - Freqüência de animais positivos para *Ureaplasma* spp. segundo categorias etárias, São Paulo, 2005

Animais	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Jovens	55%(22/40)	70%(14/20)	0.402
Adultos	45%(18/40)	30%(6/20)	-
Total	40	20	-

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Das 60 amostras colhidas de muco vulvovaginal submetidas a PCR e 40 foram positivas para *Ureaplasma* spp., sendo que 22 foram animais jovens e 18 animais adultos (Vide Tabela 16). Dos 20 animais restantes negativos para *Ureaplasma* spp. 14 eram jovens e 6 adultos. Não se verificou associação estatisticamente significativa entre a faixa etária dos animais e a detecção ou não do *Ureaplasma* spp..

Tabela 17 - Freqüência de animais positivos para *Ureaplasma* spp. segundo a presença ou não de alterações encontradas no exame clínico específico da região da vulva, São Paulo, 2005

Alterações	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Assimetria Vulvar	7,5%(3/40)	5%(1/20)	Assimetria Vulvar
Corrimento	5%(2/40)	0%(0/20)	Corrimento
De Posição	2,5%(1/40)	0%(0/20)	De Posição
Edema	17,5%(7/40)	0%(0/20)	Edema
Hiperêmica	5%(2/40)	5%(1/20)	Hiperêmica
Hipocorada	2,5%(1/40)	5%(1/20)	Hipocorada
Pigmentação da Pele	27,5%(11/40)	30%(6/20)	Pigmentação da Pele

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

A relação entre as 60 amostras diagnosticadas pela PCR e as alterações observadas na vagina, não apresentaram valores estatisticamente significantes (Tabela 17), tendo maior frequência a presença de coloração alterada da vulva (17) e edema (7) que foi o que mais se aproximou do valor estatisticamente significativo (0.084).

Tabela 18 - Frequência de alterações na vagina em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp., São Paulo, 2005

Alterações	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Catarro Genital	12,5%(5/40)	15%(3/20)	1.000
Edema	2,5%(1/40)	5%(1/20)	1.000
Eritema	15%(6/40)	0%(0/20)	0.165
Hipercorada	25%(10/40)	30%(6/20)	0.760
Hipocorada	5%(2/40)	0%(0/20)	0.548
Lesão Granulosa	47,5%(19/40)	40%(8/20)	0.784
Nódulo	0%(0/40)	0%(0/20)	-
Petúquia	7,5%(3/40)	0%(0/20)	0.544
Pústula	5%(2/40)	5%(1/20)	1.000
Sangue	5%(2/40)	0%(0/20)	0.548
Telangectasia	5%(2/40)	5%(1/20)	1.000
Trauma	0%(0/40)	5%(1/20)	0.333
Urovagina	2,5%(1/40)	5%(1/20)	1.000

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Na PCR a presença de lesões granulosas foi o sinal clínico mais freqüente, não apresentando associação estatisticamente significativa com a condição de positivas. Verificou-se coloração hiperêmica em 10 animais, eritema em 6 e presença de catarro genital em 5, nenhum dos 3 sinais apresentaram valor menor que 0,05, e nenhum nódulo foi observado nos 60 animais (Tabela 18).

*Tabela 19 - Frequência de vulvovaginite em animais infectados e não infectados por *Ureaplasma* spp., São Paulo, 2005*

	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Vulvovaginite	72,5%(29/40)	55%(11/20)	0.287

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Devido à técnica de PCR ser mais sensível para a detecção do microorganismo, notou-se que houve uma número maior de amostras positivas para *Ureaplasma* spp. do que pela técnica do isolamento. Devido a este número maior de amostras obteve-se uma maior frequência de animais com vulvovaginite e positivos para *Ureaplasma* spp. (29 de 60 animais). Entretanto, não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de vulvovaginite e condição de positivos para *Ureaplasma* spp..

*Tabela 20 - Frequência de alterações do histórico do animal relacionados ao sistema reprodutivo em animais infectados e não infectados por *Ureaplasma* spp.. São Paulo, 2005*

Alterações no Histórico	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Reprodutivo			
Aborto	10%(4/40)	10%(2/20)	1.000
Distocia	2,5%(1/40)	5%(1/20)	1.000
Fetos Prematuros	0%(0/40)	0%(0/20)	-
Morte Neonatal	17,5%(7/40)	10%(2/20)	0.704
Problemas com Neonato	5%(2/40)	0%(0/20)	0.548
Prolapso	0%(0/40)	5%(1/20)	0.333
Retenção de Secundinas	5%(2/40)	0%(0/20)	0.548

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

A morte neonatal em filhotes de animais positivos pelo PCR foi o problema reprodutivo de maior frequência, mas assim como os outros registrados não apresentaram valores menores que 0.05 e não foram estatisticamente significantes (Vide Tabela 20).

Tabela 21 - Frequência de alterações nos diversos sistemas e no escore corporal dos animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp., São Paulo, 2005

Alterações nos sistemas e Escore Corporal	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Sistema Digestório	0%(0/40)	0%(0/20)	-
Sistema Locomotor	2,5%(1/40)	0%(0/20)	1.000
Sistema Respiratório	0%(0/40)	0%(0/20)	-
Sistema Urinário	0%(0/40)	0%(0/20)	-
Glândula Mamaria	2,5%(1/40)	5%(1/20)	1.000
Pele e Anexos	5%(2/40)	5%(1/20)	1.000
Escore Corporal < 2,5	20%(8/40)	10%(2/20)	0.471

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

O escore corporal baixo foi a alteração mais freqüente entre as 60 amostras diagnosticadas pela PCR para *Ureaplasma* spp., ocorreu em 8 animais (Tabela 18). Os outros sistemas também afetados durante o estudo foram pele e anexos, locomotor e mamário que assim como escore corporal baixo não apresentou associação estatisticamente significativa com a condição de positivo. Nos demais sistemas não foi diagnosticado nenhuma alteração.

5.1.11 *Resultados das Freqüências de Ureaplasma spp. e dos Sinais Estudados pela Técnica de Cultura em Placa*

Tabela 22 - Freqüência de animais positivos para Ureaplasma spp. segundo categorias etárias pela técnica de cultura em placa, São Paulo, 2005

Animais	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Jovens	42,8%(3/7)	60%(9/15)	0.652
Adultos	57,2%(4/7)	40%(6/15)	-
Total	7	15	-

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Na realização do cultivo bacteriano para *Ureaplasma* spp. das 60 amostras, 22 não contaminaram e pode-se obter o diagnóstico. Dessas amostras, 3 isolados eram de animais jovens, e 4 isolados eram de animais adultos. Mesmo obtendo-se diagnóstico positivo não houve associação estatisticamente significativa entre a idade dos animais e a presença de *Ureaplasma* spp.

Tabela 23 - Freqüência de alterações na vulva em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. e isolados em meio de cultura em placa, São Paulo, 2005

Alterações	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Assimetria Vulvar	0% (0/7)	6,6%(1/15)	1.000
Corrimento	14,3%(1/7)	0%(0/15)	0.318
Edema	42,8%(3/7)	6,6%(1/15)	0.077
De Posição	0% (0/7)	6,6%(1/15)	1.000
Hiperêmica	28,6%(2/7)	0%(0/15)	0.091
Hipocorada	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Pigmentação da Pele	42,8%(3/7)	26,6%(4/15)	0.630
Tamanho Reduzido	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Trauma	0% (0/7)	6,6%(1/15)	1.000

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Das amostras onde foi realizado o diagnóstico através do isolamento, as alterações observadas e podendo estar associados a presença de *Ureaplasma* spp. foram alteração de pigmentação da pele, edema, coloração hiperêmica e corrimento, nenhum desses sinais apresentaram associação estatisticamente significativa com a condição de positivos. Os demais sinais clínicos não foram observados (Vide Tabela 23).

Tabela 24 - Frequência de alterações na vagina em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. isolados em meio de cultura em placa, São Paulo, 2005

Alterações	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Catarro Genital	14,3%(1/7)	0%(0/15)	0.318
Edema	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Eritema	14,3%(1/7)	6,6%(1/15)	1.000
Hipercorada	42,8%(3/7)	20%(3/15)	0.334
Hipocorada	28,6%(2/7)	0%(0/15)	0.091
Lesão Granulosa	71,4(5/7)	40%(6/15)	0.361
Nódulo	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Petéquia	0% (0/7)	20%(3/15)	0.523
Pústula	28,6%(2/7)	0%(0/15)	0.091
Sangue	14,3%(1/7)	0%(0/15)	0.318
Telangectasia	28,6%(2/7)	0%(0/15)	0.091
Trauma	0% (0/7)	6,6%(1/15)	1.000
Urovagina	0% (0/7)	6,6%(1/15)	1.000

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

As alterações na região vulvar com maior frequência das 22 amostras diagnosticadas por isolamento foi a presença de lesão granulosa que não obteve valor significativo entre positivos e negativos (Tabela 24), porém os sinais que mais se aproximaram do valor de p menor que 0,05 foram a presença de telangectasia,

pústulas e coloração hipocorada que também não apresentaram valor estatisticamente significativo ($p=0.091$). A presença de nódulo, trauma e urovagina não foi observado em nenhuma das 22 amostras.

Tabela 25 - Freqüência de vulvovaginite em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. e isolados em meio de cultura em placa, São Paulo, 2005

	% (Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Vulvovaginite	100%(7/7)	53,3%(8/15)	0,051

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

A presença de vulvovaginite foi diagnosticada no exame clínico da vulva quando observou-se uma das lesões referidas no Tabela acima (Tabelas 20 e 21), com isso dos 22 animais onde foi possível a realização do cultivo bacteriano, 7 foram diagnosticada a vulvovaginite e eram positivas para *Ureaplasma* spp.(Vide Tabela 25). Dos animais negativos 7 eram saudáveis e 8 apresentavam sinais de vulvovaginite. A associação entre a presença ou não de *Ureaplasma* spp. em animais saudáveis e com vulvovaginite não foi significativa ($p=0.051$).

Tabela 26 - Frequência de alterações do histórico do animal relacionados ao sistema reprodutivo em animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. isolados em meio de cultura em placa, São Paulo, 2005

Alterações no Histórico	%(Nº de animais/Total de animais)		p
	Positivos	Negativos	
Reprodutivo			
Aborto	0% (0/7)	6,6%(1/15)	1.000
Distocia	0% (0/7)	6,6%(1/15)	1.000
Fetos Prematuros	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Morte Neonatal	14,3%(1/7)	20%(3/15)	1.000
Problemas com Neonato	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Prolapso	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Retenção de Secundinas	0% (0/7)	0%(0/15)	-

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Nas 22 amostras submetidas ao isolamento, o histórico reprodutivo desses animais demonstrou que apenas 1 dos animais positivos já havia apresentado problemas reprodutivos que foi a morte neonatal, esse único caso não foi suficiente para se demonstrar associação estatisticamente significativa entre os grupos (Vide Tabela 26).

Tabela 27 - Frequência de alterações nos diversos sistemas e no escore corporal dos animais infectados e não infectados por Ureaplasma spp. isolados em meio de cultivo em placa, São Paulo, 2005

Alterações nos Sistemas e Escore Corporal	%(Nº de animais/Total de animais)		P
	Positivos	Negativos	
Sistema Digestório	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Sistema Locomotor	0% (0/7)	6,6%(1/15)	1.000
Sistema Respiratório	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Sistema Urinário	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Glândula Mamaria	0% (0/7)	0%(0/15)	-
Pele e Anexos	0% (0/7)	13,3%(2/15)	1.000
Escore Corporal < 2,5	42,8%(3/7)	6,6%(1/15)	0.077

Valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes

Nas 22 amostras onde foi realizado o isolamento, observou-se em 3 animais um déficit no escore corporal e que quando foi relacionado com a presença de *Ureaplasma* spp. não se obteve valor estatisticamente significativo (Tabela 27).

5.1.12 Resultados das Frequências de *Acholeplasma laidlawii* e dos Sinais Estudados por Meio da Técnica de PCR

Das 60 amostras colhidas de mucovaginal, apenas 1 animal adulto foi positivo no PCR para *Acholeplasma laidlawii*, e não se verificou associação estatisticamente significativa entre a idade dos animais e sua presença. Dentre as alterações encontradas no trato reprodutivo estavam: presença de corrimento ($p=0,033$) e mucosa hiperêmica da vulva ($p=0,05$) apresentando associação com a condição de positivo para *Acholeplasma laidlawii*.

Na vagina desse animal positivo foi observado: presença de catarro genital ($p= 0.133$), mucosa hipercorada ($p= 0.267$), lesão granulomatosa ($p= 0.450$) e telangectasia ($p= 0.05$) que foi a única alteração observada na vulva que obteve associação a presença de *Acholeplasma laidlawii*.

A detecção de um animal positivo não foi suficiente ocorrer a associação de *Acholeplasma laidlawii* com a presença de vulvovaginite ($p=1.000$).

Não foi observado alterações no histórico reprodutivo e nos sistemas do animal positivo, somente foi notado escore corporal < 2 ($p= 1.000$). Lembrando que valores de $p \leq 0.05$ são estatisticamente significantes.

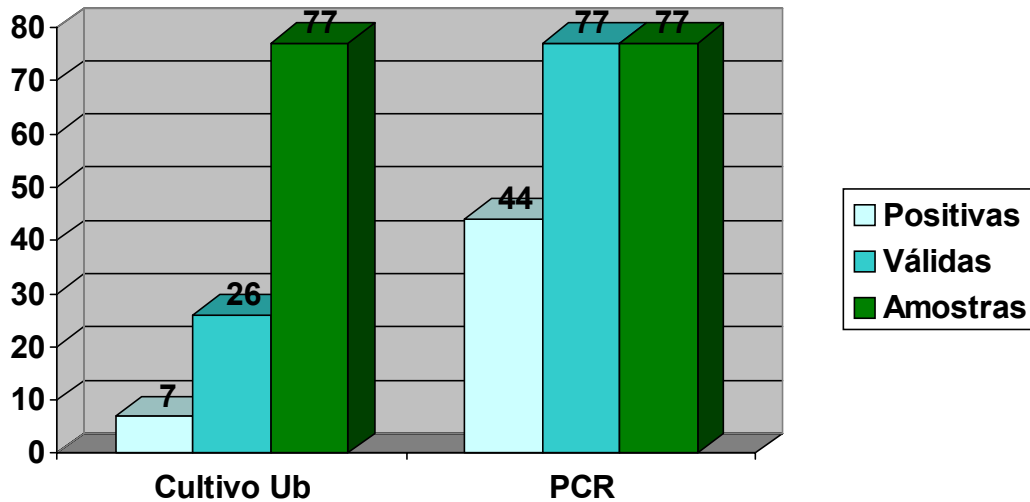


Figura 11 - Demonstração do número de amostras e o grau de aproveitamento para o diagnóstico de *Ureaplasmas* entre a técnica de isolamento e da PCR

O gráfico 1 mostra o aproveitamento das amostras colhidas em relação à técnica diagnóstica utilizada. Das 77 amostras colhidas para realização do diagnóstico através do isolamento de *Ureaplasma* spp. , apenas 26 foram possíveis de se realizar o diagnóstico sem que ocorresse a contaminação da amostra por outras bactérias. Destas amostras em 7 cresceram colônias de *Ureaplasma* spp. nas placas de cultivo. Ao se utilizar a PCR para realização do diagnóstico dessas mesmas amostras, foi possível o diagnóstico de 100% das amostras, pois não houve o problema da contaminação, sendo 44 positivas para *Ureaplasma* spp.. Das 77 amostras, 17 eram do projeto piloto e não foram realizadas a avaliação e ficha clínica dos animais e por isto não entraram na estatística do trabalho.

6 DISCUSSÃO

Com a crescente demanda por produtos caprinos e ovinos, tem crescido o número de empresários dispostos a investir nessas atividades, a agroindústria instalada e as tecnologias já disponibilizadas pela pesquisa, capazes de atender aos diversos segmentos da cadeia produtiva, a caprino-ovinocultura irá se destacar no cenário brasileiro como atividade de grande impacto sócio-econômico.

Subnutrição, doenças debilitantes, infecto-contagiosas e manejo inadequado são as principais causas do mau desempenho reprodutivo, com quebra na produção de leite e carne, devido a ocorrência de abortamentos e infertilidade (GENOVEZ, 2003). Num rebanho livre de doenças, a alimentação passa a ser o principal fator de deficiência reprodutiva. Se as carências nutricionais são supridas, os problemas reprodutivos infecciosos passam a se constituírem num dos mais importantes fatores limitantes da expansão da pecuária, com implicações na comercialização internacional. Enfermidades bacterianas e parasitárias como brucelose, leptospirose, toxoplasmose e neosporidiose ou neosporose entre outras (GENNARI, informação verbal, 2005)¹, ainda são problemas para os rebanhos nacionais, embora dados reais não sejam conhecidos. Pesquisas em ovinos e caprinos têm sido renegadas em virtude da bovinocultura ter um papel econômico importante na atividade pecuária nacional, o quadro, porém da pecuária está se modificando devido aos novos programas governamentais de políticas públicas visando o incremento de atividades para o pequeno agricultor. Esta forma alternativa de agricultura auto-sustentável vem trazendo a caprino e ovinocultura a um desenvolvimento crescente, fazendo com que os pesquisadores iniciem suas atividades nesta área para que se obtenha dados estatísticos das doenças já que não há dados epidemiológicos confiáveis, atualmente (Programa Nacional de Sanidade de Ovinos e Caprinos, 2004).

A patogenicidade de algumas espécies de micoplasmas tem sido questionada principalmente quando encontradas em hospedeiros saudáveis associadas a afecções não usuais. Este aspecto mantém a comunidade científica atenta para a questão da falta ou mesmo pela dificuldade de comprovação dos fatos (BASEMAN; TULLY, 1997). Entre os micoplasmas de origem animal, este aspecto, embora descrito em poucas espécies, é mais complexo pela diversidade de espécies destas bactérias e dos respectivos hospedeiros. Assim, o encontro de micoplasmas não usualmente associados aos problemas reprodutivos em ovinos não pode ser desconsiderado.

A necessidade de se viabilizar técnicas mais eficientes para o diagnóstico de distúrbios reprodutivos que têm como causa agentes infecciosos, no caso principalmente das micoplasmoses, são de grande importância para se obter um controle mais efetivo desta doença, diminuindo desta forma as perdas econômicas do produtor.

O diagnóstico de micoplasmoses realizado em casos de distúrbios reprodutivos não são processados de forma ampla em nosso país, o que dificulta avaliar o real envolvimento destes microorganismos nestas enfermidades. Pesquisas relacionadas à epidemiologia destes microorganismos bem como a patogenicidade devem ser realizadas, para que se possa melhor entender e assim controlar os distúrbios causados pelos Mollicutes.

No presente trabalho de acordo com o objetivo proposto encontrou-se a presença de micoplasmoses no trato reprodutivo de fêmeas ovinas de acordo como cita outros autores (BALL; LIVINGSTONE JUNIOR; GAUER, 1983; DOIG; RUHNKE, 1977; MCCAUGHEY, 1982; SINGH; RAJYAN; MOHANTY, 1974).

A associação dos micoplasmas com patologias no trato reprodutivo ainda deve ser mais estudada no Brasil. A avaliação dos resultados desta pesquisa, ainda não

foi possível provar ser as micoplasmoses em ovinos a maior causadora de distúrbios relacionados a produção desta espécie animal, e como alguns autores citam a presença do microorganismo não significa presença da doença. Este aspecto ainda é muito controverso devido aos animais sadios também serem portadores desta bactéria em várias outras espécies (DOIG et al., 1979; REID et al., 1989; SARDERSON; CHENOWETH, 1999).

Durante o processamento das amostras notou-se que a detecção do micoplasma genérico era muito maior do que os micoplasmas isolados e buscou-se então a identificação das amostras através do PCR específico (*Mycoplasma* spp.; *Ureaplasma* spp. e *Acholeplasma laidlawii*). Não foi possível determinar as espécies em questão somente para o *Acholeplasma laidlawii*, abrindo-se um campo para o seqüenciamento dos isolados, que certamente trará resultados inovadores como o descobrimento de uma nova espécie de *Ureaplasma* no Brasil. Com a análise dos resultados há uma suposição de que os micoplasmas encontrados não sejam espécie-específicos como relatam alguns autores. Acredita-se após a avaliação dos resultados que também em ovinos existe um complexo de micoplasmas comuns a esta espécie de animais sendo associadas aos distúrbios reprodutivos (JONES et al., 1983; NICHOLAS et al., 1999).

Após a pesquisa nos animais de campo notou-se que as observações deste estudo estão de acordo com informações obtidas em pesquisas anteriores que não estabelecem claramente a causa, epidemiologia, características clínicas, imunopatologia e controle da vulvovaginite. Nos resultados encontrados as diferentes formas de vulvovaginite podem ser classificadas em vulvovaginite granular, vulvovaginite (presença de petéquias e vesículas) e vulvite não sendo realmente estabelecido a causa verdadeira dessas diferentes lesões. Procurou-se

estudar estas lesões separadamente e associadas para avaliar o grau de comprometimento dos micoplasmas com essas alterações e não obteve-se relação estatisticamente significativa concordando com os estudos de diversos pesquisadores (BALL; MCCAUGHEY, 1982; COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; DUNN, 1996; IHEMELANDU, 1972; KIDANEMARIAM, 2003; TRICHARD et al., 1993; WEBB; CHICK, 1976).

Durante a pesquisa procurou-se isolar outros tipos de agentes relacionados com a vulvovaginite sendo que as amostras resultaram negativas não correlacionando a enfermidade com outro agente etiológico. A presença de contaminações pode ter impedido este isolamento. Devido a este fato há correlação positiva com os achados de Webb e Chick, (1976) onde a presença de agentes infecciosos associados com a doença não tem demonstrado a constância de um organismo específico. Após a análise dos resultados notou-se que há uma diversidade de alterações ou manifestações que são classificadas como vulvovaginite o que leva a crer segundo a literatura que a doença possui diferentes fases, e deve ser diagnosticada logo no início dos primeiros sinais para se obter uma eficiência melhor no exame complementar bacteriológico, pois dependendo da invasão bacteriana secundária e da fase da enfermidade, haverá uma diferenciação dos sinais clínicos como citam vários autores (DENT, 1971; KIDANEMARIAM, 2003; TRICHARD et al., 1993; WEBB; CHICK 1976).

Nos resultados obtidos foi isolado em meio de cultura pela primeira vez no Brasil na região vulvovaginal, *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp. e detectado o *Acholeplasma laidlawii* espécies que são consideradas por diversos pesquisadores como prováveis causadoras de enfermidades no trato genital de pequenos ruminantes. Não foi possível provar que estas espécies possuíam este potencial

patogênico, pois como é observado na literatura referida, existem diferentes cepas deste microorganismo com variáveis graus de patogenicidade. Acredita-se que as cepas isoladas nesta pesquisa não correspondiam a cepas agressivas que podem causar abortos. Estudos posteriores vão ser realizados para identificar quais são as espécies envolvidas, através do seqüenciamento e de identificação de outras espécies pelo PCR específico destes achados, com o intuito de comparar com os achados citados na literatura (BALL; MCCAUGHEY, 1979,1982; COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; JONES, 1983; JONES et al., 1983; KAPOOR; SINGH; PATHAK, 1984; KAPOOR et al., 1984; KIDANEMARIAM, 2003; LIVINGDTONE; GAUER, 1982; TRICHARD et al., 1993).

Durante as nossas pesquisas não observamos nenhuma manifestação nas lesões encontradas que sugerisse que a vulvite poderia ser causada por um agente viral, concordando com a literatura que eles não são responsáveis por um possível envolvimento nesta enfermidade (WEBB; CHICK, 1976; TRICHARD et al., 1993). Pelos resultados encontrados há a evidência que bactérias contaminantes poderiam ser patogênicas e estar associadas com a vulvite encontrada (BALL; MCCAUGHEY, 1982).

Lesões ulcerativas da vulva como descrevem alguns autores não foram observadas nos animais, e não houve por esta razão a possibilidade de correlação com a presença de micoplasmoses durante o trabalho. Acredita-se que lesões ulcerativas na vulvovaginite apareceria em uma fase mais evoluída da doença em que após a eclosão de vesículas, formaria no mesmo local este tipo de alteração. Estudos histopatológicos das diversas fases da vulvovaginite seria interessante para avaliar estas diversas lesões e o prognóstico da enfermidade dependendo da fase da doença (JONES et al., 1983). Assim como alguns autores encontrou-se nesta

pesquisa em alguns casos a associação entre *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. em ovelhas acometidos por doenças associadas a vulvovaginite (BALL; MCCAUGHEY, 1982; COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; DOIG; RUHNKE, 1977; TRICHARD et al., 1993), não foi possível a avaliação estatística deste grupo por ser um número insuficiente e por dificuldade de identificação destas amostras devido às técnicas diagnósticas utilizadas.

Não foi possível avaliar a fase do ciclo estral em que a vulvovaginite era mais prevalente devido as dificuldades de transporte e acompanhamento diário dos animais para assim comparar os resultados da pesquisa com os achados de alguns autores, que relataram que a ocorrência de vulvovaginite está presente antes do cio (MCCAUGHEY; BALL, 1995), durante a estação de monta (JONES et al., 1983; ROBERTS; BOLTON, 1945) e após o parto (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; JONES et al., 1983).

Ao avaliar-se as perdas reprodutivas dos animais acometidos por vulvovaginite com ou sem a presença de micoplasmoses, não se encontrou nenhuma correlação com as perdas na produção dos animais avaliados. Discorda-se então com os resultados e citações de muitos autores, pois nesta pesquisa segundo o relato dos tratadores todos os animais avaliados não possuíam relatos de aborto ou infertilidade freqüentes (BALL; MCCAUGHEY, 1982; COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; DOIG; RUHNKE, 1977; JONES et al., 1983; LIVINGSTONE JUNIOR; GAUER, 1983; SINGH; RAJYAN; MOHANTY, 1974; TRICHARD et al., 1993).

Estudos sobre a importância das micoplasmoses e suas diferentes espécies já conhecidas ainda devem ser realizadas no Brasil. Esta pesquisa é pioneira neste aspecto, pois ainda não se sabe da problemática deste microorganismo e da sua

ocorrência em diversas regiões. Após este estudo inicial deve-se continuar as pesquisas para elaborar metodologias de identificação de espécies compatíveis com os nossos laboratórios no Brasil, que ainda apresentam muitas dificuldades financeiras para a padronização destas técnicas. Com o advento do Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos o Ministério da Agricultura deve preocupar-se agora em auxiliar os laboratórios existentes quanto a estes problemas reais promovendo assim um avanço tecnológico na área de controle de doenças nesta espécie animal. Durante a pesquisa nenhuma situação alarmante foi encontrada na região de Piedade como abortos em massa ocorridos na África do Sul em animais da raça Dorper citados na literatura e causada por uma espécie que ainda não foi identificada no Brasil. Pode-se salientar então, que apesar dos achados desta pesquisa, e ao comparar com os resultados de Livingston Junior e Gauer, (1983) nota-se que há discordâncias no mesmo trabalho, pois sendo isolado o microorganismo estudado na mesma região, Texas nos Estados Unidos, em 2 rebanhos eles causaram perdas reprodutivos e outros 2 rebanhos não, semelhantes aos resultados encontrados Ball e McCaughey (1982) e McCaughey, Ball e Irwin (1979) na Irlanda do Norte.

Acredita-se que as cepas mais patogênicas ainda não estão presentes na nossa área, fato este que deve-se ser discutido para que a vigilância epidemiológica local tome devidas providências no controle da possível entrada de agentes mais agressivos (DAMASSA; BROOKS; ADLER, 1983; KINADEMARIAM, 2003; PUGH, 2005; RODRIGUEZ et al., 1995; TRICHARD et al., 1993).

Os resultados da pesquisa prova e concorda com o relato de alguns autores e principalmente com Livingston Junior e Gauer, (1983) onde os animais com isolamento ou que foi detectado micoplasmoses no trato genital tanto de ovelhas

com problemas reprodutivos como de rebanhos aparentemente normais não houve a possibilidade de se estabelecer uma correlação positiva com o papel etiológico desse microorganismo com a presença de distúrbios reprodutivos (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; LIVINGSTONE JUNIOR; GAUER, 1983; KAPOOR; SINGH; PATHAK, 1984; NICHOLAS et al., 1999).

A avaliação das manifestações causadas pelas micoplasmoses em ovinos não permitiu concluir qual o tipo de lesão causada por este gênero, havendo relatos de várias alterações também em outras espécies na literatura como o de Rana, Gupta e Banga (1993), que inocularam experimentalmente *Mycoplasma sorogrupo 11* e observaram lesões severas de vulvovaginite granular, caracterizada pela presença de nódulos brancos e edema de mucosa vaginal, cervicite linfática, endometrite e leve ooforite após exames clínicos e histológicos, concluindo que ele foi patológico para o trato genital caprino.

Durante a pesquisa não foi realizado a inoculação experimental de amostras positivas para avaliação da possível reinfecção e patogenicidade das cepas encontradas. Uma nova pesquisa deve ser realizada para avaliar o grau de patogenicidade e infectividade destas cepas encontradas. Trabalhos referidos na literatura sugestionam em diversos países o envolvimento de algumas cepas com distúrbios reprodutivos como na Austrália, Inglaterra e Estados Unidos por exemplo, sendo que nestes países a reinfecção por *Mycoplasma 2D* e *MmmLC* não reproduziram completamente a doença, apesar de existirem apenas fortes evidências que sugestionam o envolvimento desta espécie com surtos de vulvovaginite (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; JONES, 1983; LIVINGSTONE JUNIOR; GAUER, 1983). Outra espécie citada na literatura como possível agente da vulvovaginite granular espontânea é a *Mycoplasma agalactiae*

(GIL et al., 2003; PUGH, 2005; SINGH; RAJYA; MOHANTY, 1974). Nos achados também evidenciou-se a presença de lesões características de grânulos do tamanho de “cabeça de alfinete” amarelo-esbraquiçado e translúcido dispostos de forma linear próximo ao clitóris, hiperemia de mucosa e edema além da presença de exsudato purulento (SINGH; RAJYA; MOHANTY, 1974,1975), mas não houve a possibilidade de correlacionar estas manifestações com a presença desta mesma espécie e mesmo outras micoplasmoses. Durante a nossa pesquisa houve a possibilidade de encontrar o microorganismo no sêmen dos animais que conviviam com as fêmeas infectadas. Provou-se também que um macho sabidamente positivo infectou uma fêmea negativa através da monta natural. Este achado foi realizado após a leitura, de uma placa de meio semeada com muco vaginal de uma fêmea que acabava de ter sido coberta e que apresentava crescimento de *Ureaplasma* spp. Após avaliação do sêmen deste animal também foi observado mudanças na qualidade seminal como foi observado por Ak et al., (1995) e Livingstone Junior e Gauer, 1982, e não observado por Gregory et al., informação verbal, 2005.

O nosso achado de *Ureaplasma* spp. no sêmen de fêmeas cobertas por animais infectados coloca o Brasil entre os países em que a doença já foi relatada como citam alguns autores (BALL; MCCAUGHEY, 1982; DOIG; RUHNKE, 1977; GREGORY et al., 2004; JONES et al., 1983; MCCAUGHEY; BALL, 1981; MCCAUGHEY; BALL; IRWIN, 1979). Durante a pesquisa não houve nenhuma correlação entre a presença de *Ureaplasma* spp. e alterações do trato genital de ovinos concordando com alguns autores (JONES; RAE, 1979; LIVINGSTONE JUNIOR; GAUER, 1975; MCCAUGHEY; BALL, 1981; MCCAUGHEY; BALL; IRWIN, 1979). Alguns relatos acreditam que vários sorotipos tem se demonstrado associado com doenças de ovinos (COTTEW; LLOYD; PARSONSON, 1974; LIVINGSTONE

JUNIOR; GAUER, 1982) não foi possível nesta pesquisa avaliar o sorotipo do isolado em questão, por acreditar ser uma nova espécie. Por esta razão pode-se sugerir que talvez o *Ureaplasma* isolado não esteja relacionada com nenhuma cepa patogênica (JONES; RAE, 1979).

Devido a dificuldade de identificar os diferentes sorotipos existentes não foi possível avaliar o sorotipo do *Ureaplasma* spp. em questão com possíveis problemas de fertilidade como pesquisou Livingston Junior e Gauer, (1978) talvez como estes autores encontraram 9 sorotipos diferentes e acreditando que o sorotipo IX esteja relacionado com os casos de infertilidade, o sorotipo encontrado provavelmente não tenha sido o sorotipo IX pois não houve nenhuma correlação no trabalho com a presença do microorganismo e casos de alterações no trato reprodutivo. De acordo com alguns estudos acredita-se que imunidade em animais adultos pode ser um fator fundamental na persistência do microorganismo no trato genital, estes estudos relatam que fêmeas virgens poderiam ser mais predispostas a apresentarem a infecção, fato não correspondente com os achados desta pesquisa, em que encontrou-se correlação nenhuma entre animais jovens e adultos e a presença de micoplasmoses (BALL; MCCAUGHEY, 1982; BALL; MCCAUGHEY; IRWIN, 1984).

Trabalhos demonstrando a transmissão venérea estão de acordos com os resultados desta pesquisa (BALL; MCCAUGHEY; IRWIN, 1984) ao contrário com outros relatos de achados de morte neonatal devido nascimento de cordeiros fracos, repetição de cio, perdas reprodutivas na concepção, durante as fases iniciais da prenhes e interferência no desenvolvimento normal do feto (LIVINGSTONE JUNIOR; GAUER, 1982) placentite sem o abortamento em surtos da doença (PUGH, 2005)

estão discordantes desta pesquisa que não encontrou nenhum destes achados acima relacionados durante em dois anos de observação na região de Piedade.

De acordo com os resultados estabelecidos nesta pesquisa sobre a localização das lesões provocada pelos micoplasmas há uma correlação positiva com os achados de McCaughey e Ball (1981) que observaram uma significativa incidência de isolamentos de ureaplasma na região vestibular da vulva.

A variável idade foi estudada nesta pesquisa onde os grupos foram separados entre jovens e adultos, estudos mostraram que a infecção ocorre mais frequentemente em ovelhas velhas, eles acham que nelas permanecem como portadores por longos períodos após a infecção primária, esta afirmação não está de acordo com esta pesquisa que não notou influência da idade entre os animais infectados ou não (LANGFORD, 1975; MCCAUGHEY; BALL, 1981). Não há nenhuma evidência em que os animais sejam reinfectedos devido a infecção perianal das fêmeas sem a presença do macho, fato relatados por McCaughey e Ball, (1983), de acordo com os resultados e as observações a transmissão através da monta por machos infectados seriam a maior fonte de reinfecção das fêmeas do rebanho.

Alguns autores citam que o aumento de isolados de ureaplasma em um rebanho está relacionado com fases de estresse que o animal é submetido como, estresse físico, tratamentos de sincronização de cio e parto, este fato não pode ser avaliado por este estudo devido ao sistema de criação submetidos nas fazendas visitadas serem um sistema extensivo com monta natural o ano inteiro e sem tratamento de sincronização (LIVINGSTONE JUNIOR; GAUER, 1982, MCCAUGHEY; BALL, 1979). As alterações encontradas por McCaughey e Ball (1985) onde relacionaram o estro com a maior incidência de alterações vulvares, não

foi possível realizar esta observação nesta pesquisa devido ao grupo de animais sorteados para este estudo estarem em diversas fases do ciclo, mesmo assim através das observações realizadas por este autor de que a diferença entre o edema e eritema vulvar entre animais infectados e não infectados embora estatisticamente significativa ainda não é fator marcante para o diagnóstico da vulvovaginite por ureaplasma.

No caso do *Acholeplasma laidwaili* apesar uma amostras apresentar-se positivas, não houve evidência de que este microorganismo fosse causador das possíveis lesões encontradas e concorda-se com a literatura que a sua patogenia ainda não é definitivamente confirmada. Há relatos como Tiwana e Singh (1982) que também isolaram *Acholeplasma oculi* de material obtido do canal vulvovaginal e útero e encontraram 22 ovelhas com lesões de vulvovaginite só que não fizeram uma comparação com animais normais para avaliar se o agente primário realmente eram os micoplasmas. Há ainda muita controvérsia entre as opiniões dos pesquisadores que acreditam que algumas cepas de *Acholeplasma* spp. (GUPTA et al., 1990; JONES et al., 1983) sejam patogênicas, este fato não está de acordo com os resultados desta pesquisa concordando com Kapoor, Singh e Pathak (1984) e Jones e Rae (1979).

7 CONCLUSÕES

1- O método de colheita de muco vulvovaginal ovino por meio de zaragatoas, mostrou-se satisfatório para o cultivo de micoplasmas e ureaplasmas e na obtenção do DNA para a realização da PCR dos micoplasmas;

2 - A PCR realizada com primers genéricos foi importante para se realizar uma triagem nas amostras clínicas para posterior identificação, mostrando ser uma metodologia sensível.

3 - Foi obtido o isolamento e a detecção de *Mycoplasma* spp, *Ureaplasma* spp. e *Acholeplasma laidlawii* em porcentagem das amostras analisadas.

Tabela 28 - Porcentagem de animais positivos nas 60 amostras de zaragatoa vulvovaginal, segundo a técnica diagnóstica utilizada. São Paulo, 2005

Técnica Diagnóstico	Micoplasma	% (Nº de animais/Total de animais)
PCR	Micoplasma genérico	75% (40/60)
Isolamento	<i>Mycoplasma</i> spp.	8,3% (5/60)
PCR	<i>Ureaplasma</i> spp.	66,7%(40/60)
Isolamento	<i>Ureaplasma</i> spp.	11,7% (7/60)
PCR	<i>Acholeplasma laidwail</i>	1,7% (1/60)

4 - Foi isolado pela primeira vez no Brasil *Mycoplasma* spp. em vagina de ovinos.

5 - Foi isolado pela primeira vez no Brasil *Ureaplasma* spp. em vagina de ovinos.

6 - Foi detectado pela primeira vez no Brasil *Acholeplasma laidlawii* em vagina de ovinos.

7 – Não foi comprovada a associação de micoplasmas com a presença de alterações no trato reprodutivo de fêmeas ovinas na região de Piedade.

8 – Foi comprovada a infecção da fêmea ovina através de monta natural por um macho infectado, provando que a principal fonte de infecção dos animais é através do coito.

9 - Durante o estudo houve crescimento em meio U_B de colônias de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp.. Pela primeira vez no mundo houve o crescimento neste meio dos dois microorganismos associados.

8. REFERÊNCIAS

- AK, K.; AK, S.; GUREL, A.; HASOKSUZ, M.; BARAU, A.; OZTURKELER, Y.; ILERI, I. K.; MINBAY, A. Experimental studies on the effects of *Mycoplasma agalactiae* on the spermatozoa and genital organs of rams. **Pendik Vet. Mikrobiyol.**, v. 26, p. 139-155, 1995.
- AL-AUBAIDI, J. M.; DARDINI, A. H.; MUSCOPLATT, C. C.; MCCAULEY. Identification and characterization of *Acholeplasma oculusi* spec. nov. from the eyes of goats. *The Cornell Veterinarian*, v.63, n.1, p.117-129, 1973.
- AYLING, R. D.; BASHIRUDDIN, S. E.; NICHOLAS, R. A. J. *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. **The Veterinary Record**, v. 155, n. 2, p. 413-416, 2004.
- BALL, H. J.; MCCAUGHEY, W. J. Experimental production of vulvitis in ewes with a ureaplasma isolate. **The Veterinary Record**, v. 110, n. 19, p. 581, 1982.
- BALL, H. J.; MCCAUGHEY, W. J.; IRWIN, D. Persistence of ureaplasma genital infection in naturally-infected ewes. **The British Veterinary Journal**, v. 140, n. 4, p. 347-353, 1984.
- BALL, H. J.; MCCAUGHEY, W. J.; KENNEDY, S.; McLOUGHLI, M. Experimental intrauterine inoculation of pregnant ewes with ureaplasmas. **Veterinary Research Communications**, v. 9, n. 1, p. 35-43, 1985.
- BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: sophisticated reemerging and burdened by their notoriety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 21-32, 1997.
- BAUER, F. A.; WEAR, D. J.; ANGRITT, P.; LO, S. C. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) infection in the kidneys of patients with acquired immunodeficiency syndrome and associated nephropathy: a light microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural study. **Human Pathology**, v. 22, n. 1, p. 63 - 69, 1991.
- BENESI, F. J. Aspectos Clínicos das Micoplasmoses. In: D'ANGELINO, J. L. Manejo, patologia e clínica de caprinos. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1985.
- BERGEY'S Manual of determinative bacteriology. Michigan: Michigan State University, 2001. Disponível em: <<http://www.cme.msu.edu/bergeys>>. Acesso em: 14 mar. 2005.
- BLANCHARD, A.; HAMRICK, A.; DUFFY, L.; BALDUS, K.; CASSELL, G. H. Use of the polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma fermentans* and

Mycoplasma genitalium in the urogenital tract and amniotic fluid. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 148, 1993. Supplement 1:S272-9.

BUZINHANI, M. **Detecção de micoplasmas no trato reprodutivo de fêmeas bovinas com distúrbios reprodutivos por cultivo e reação em cadeia da polimerase**. 2001. 88 p. Dissertação (Mestrato) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

CARDOSO, M. V.; GRASSO, L. M. P. S. Micoplasmoses genitais bovinos. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 60, n. 1, p. 9-15, 1998.

CARDOSO, M. V.; GREGORY, L.; TEIXEIRA, S. R.; SCARCELLI, E.; BRANDÃO, F. Z.; GENOVEZ, M. E. Alterações na qualidade seminal associadas à *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* em sêmen bovino "in natura". **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 2, p. 240 – 242, 2001.

CARMICHAEL, L. E.; St GEORGE, T. D.; SULLIVAN, N. D.; HORSFALL, N. Isolation, propagation, and characterization studies of na ovine *Mycoplasma* responsible for proliferative interstitial pneumonia. **The Cornell Veterinarian**, v. 62, n. 4, p. 654-679, 1972.

CLAYDE, W. A. *Mycoplasma*: animal host interrelationships. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Methods in Mycoplasmaology, Mycoplasma characterization**. New York: Academic Press, 1983. v. 1, p. 15-19.

CORDEIRO, P. R. C. Produção de leite de cabra no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais** Piracicaba: SBZ, 2001. p. 497.

COTTEW, G. S.; LLOYD, L. C.; PARSONSON, I. M. Isolation of mycoplasma from vulvovaginitis in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 12, p. 576-577, 1974.

COTTEW, G. S.; YEATS, F. R. Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. **Australin Veterinary Journal**, v. 59, n. 3, p. 77-81, 1982.

D'ANGELINO, J. L.; ARAÚJO, W. P.; BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J.; ORTOLANI, E. L.; ROSSINI, A. J. Aspectos clínicos da micoplasmose em bovinos. In: SEMANA DE VETERINÁRIA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1. São Paulo. **Anais** 1982, p. 77.

DAMASSA, A. J.; BROOKS, D. L.; ADLER, H. E. *Caprine mycoplasmosis: wide spread infection in goats with Mycoplasma mycoides subspecies mycoides (large colony type)*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 2, p. 322-325, 1983.

DAMASSA, A. J.; BROOKS, D. L.; HOLMBERG, C. A. Pathogenicity of *M. capricolum* and *M. putrefaciens*. **Israel Journal of Medical Science**, v. 20, n. 10, p. 975-978, 1984.

DAMASSA, A. J.; WAKENELL, P. S.; BROOKS, D. L. Mycoplasma of goats and sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation**, v. 4, n. 1, p. 101-113, 1992.

DENT, C. H. R. Ulcerative vulvitis and posthitis in Australian sheep and cattle. **The Veterinary Bulletin**, v. 41, p. 719-723, 1971.

DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L. Isolation of ureaplasma from sheep with granular vulvitis. **The Veterinary Record**, v. 100, n. 26, p. 179-180, 1977.

DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L.; MACKAY, A. L.; PALMER, N. C. Bovine granular vulvitis associated with Ureaplasma infection. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 20, n. 4, p. 89-94, 1979.

DUNN, K. Vulvitis and balanitis in a low land flock. **Proceedings of the Sheep Veterinary Society**, v. 20, p. 41-42, 1996.

DUSSURGET, O.; DUSSOIX, D. R. Rapid, Sensitive PCR- Based Detection of Mycoplasmas in Stimulated Samples of Animal Soro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 953- 959, 1994.

ERNØ, H.; AL-AUBAIDI, J. M.; OJO M. O.; MINGA, U. M.; SIKDAR, A. Classification and identification of ovine and caprine mycoplasmas. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 19, n. 3, p. 392-406, 1978.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 39, n. 4, p. 729-735, 1995.

GIL, M. C.; PEÑA, F. J.; HERDOSO DE MENDOZA, J.; GOMEZ, L. Genital lesions in na outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 50, n. 10, p. 484-487, 2003.

GOLL JR., F. Identification of mycoplasmas isolated from domestic animals. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; IAURERMAN, L. H. (Ed.). *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1994. p. 15-26.

GREGORY, L.; CARDOSO, M. V.; BIRGEL JR, E. H.; TEIXEIRA, S. R.; SOUZA, R. M.; PACHECO, W. A.; BENESI, F. J. Surto de ceratoconjutivite infecciosa dos caprinos causado por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos, criados no estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biologico de São Paulo**, v. 70, n. 2, p. 179-181, 2003.

GREGORY, L.; METTIFOGO, E.; RIZZO, H.; CARDOSO, M. V.; BUZINHANI, M.; MENEHINI, R. C. M.; TIMENESKI, J. Primeiro isolamento de *ureaplasma* sp em sêmen e zaragatoa vaginal de ovinos no Estado de São Paulo. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais** v. 1, p. 280.

GUPTA, P. P.; ANOOP SINGH; BANGA, H. S.; SINGH, S. P. Pathology of the genital tract of goats experimentally infected with *Acholeplasma laidlawii*. **Indian Veterinary Journal**, v. 67, p. 871-872, 1990.

HADRYIS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 1, n. 1, p. 55-63, 1992.

HEREMANN, R. Genome structure and organization. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Molecular biology and pathogenesis**. Washigton: American Society of Microbiology, 1992. p. 157.

HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. **Aplicação da PCR em laboratório clínico e medicina forense**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997. p. 46-67.

HOWARD, C. J.; POCOOCK, D. H. Comparison of ureaplasma from sheep and goats with *Ureaplasma diversum* and *U. urealyticum*. **Journal of General Microbiology**, v. 129, n. 10, p. 3197-3202, 1983.

IHEMELANDU, E. C. Ulcerative vulvitis in goats. **The Veterinary Record**, v. 91, n. 8, p. 197, 1972.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR MYCOPLASMAOLOGY AND OF THE INTERNATIONAL RESEARCH PROGRAM OF COMPARATIVE MYCOPLASMOLOGY. Disponível em: <<http://mycoplasmas.vvm.iastate.edu>>. Acesso em: 20 jun 2005.

JONES, G. E. Mycoplasmas of sheep and goats : A synopsis. **The Veterinary Record**, v. 113, n. 24/31, p. 619-620, 1983.

JONES, G. E.; FOGGIE, A.; SUTHERLAND, A.; HARKER, D. B. Mycoplasma and keratoconjunctivitis. **The Veterinary Record**, v. 99, p. 137-141, v. 8, 1976.

JONES, G. E.; HOLMES, R. G.; LISTER, S. A.; JONES, J. M. W.; GRATER, G. S.; RICHARDS, N. Isolation of exotic mycoplasma from sheep in England. **The Veterinary Record**, v. 113, n. 3, p. 540, 1983.

JONES, G. E.; RAE, A. E. Ureaplasma in sheep. **The Veterinary Record**, v. 104, n. 19, p. 466, 1979.

KAPOOR, S. G.; SINGH, P. P.; PATHAK, R. C. Prevalence of mycoplasma/acholeplasma in the genital tract of sheep. **The Indian Journal Animal Sciences.**, v. 54, n. 7, p. 553-556, 1984.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology**, v. 27, p. 7-14, 1998.

KIDANEMARIAM, A. **Identification and characterization of the primary infectious agents associated with ovine ulcerative balanoposthitis and vulvovaginitis in South Africa.** 2003. 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária – Microbiologia) – Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade de Pretoria, Pretoria, 2003.

KOTANI, H.; NAGATOMO, H.; OGATA, M. Isolation and serological comparison of ureaplasmas from goats and sheep. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 42, n. 1, p. 31-40, 1980.

KUMAR, A.; PATHAK, R. C. Isolation & characterization of some members of Mycoplasma & Acholeplasma from uterus of sheep & goats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 16, n. 9, p.1011-1013, 1978.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 339, n 18, p. 237-238, 1989.

LANGFORD, E. V. *Mycoplasma* species recovered from the reproductive tracts of western Canadian cows. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 39, n. 2, p. 133-138, 1975.

LAUERMAN, L. H. *Mycoplasma* PCR Assays. In: NUCLEID acid amplification assays for diagnosis of animal diseases. Abama, EUA: Dept. of Agriculture and Industries, 1998. p. 150.

LEACH, R. H.; ERNØ, H.; MACOWAN, K. J. Proposal for designation of F38-type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. nov. and consequently obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Barile, Edward, Theodore, and ErnØ, 1974) to na additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. **International Journal of Systemic Bacteriology**, v. 43, p. 603-605, 1993.

LIVINGSTON JR., C. V .; GAUER, B. B. Effect of venereal transmission of ovine ureaplasma on reproductive efficiency of ewes. **American Journal Veterinary Research**, v. 43, n. 7, p. 1190-1193, 1982.

LIVINGSTON JR., C. V ; GAUER, B. B. Isolation of T-strain mycoplasma from sheep and goats in Texas. **American Journal Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 313-314, 1975.

LIVINGSTON JR., C. V.; GAUER, B. B. A specific ureaplasma serotype associated with ovine uterine infections. **American Journal Veterinary Research**, v. 39, n. 10, p. 1699-1701, 1978.

LIVINGSTON JR., C. V.; GAUER, B. B. Occurrence of *Mycoplasma* sp (2D) in Texas sheep flocks. **American Journal Veterinary Research**, v. 44, n. 5, p. 868-869, 1983.

LO, S. C.; DAWSON, M. S.; WONG, D. M.; NEWTON, P. B.; SONODA, M. A.; ENGLER, W. F. WANG, R. V.; SHIH, J. W.; ALTER, H. J.; WEAR, D. J. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study. **Journal of Tropical Medicine and Higiene**, v. 5, n. 41, p. 601-616, 1989.

MACOWAN, K. J.; MINETTE, J. E. A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. **Tropical Animal Health and Production**, v. 8, n. 2, p. 91-95, 1976.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H. J. Distribution of ureaplasmas in the urogenital tract of ewes. **The Veterinary Record**, v. 109, n. 21, p. 472, 1981.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H. J. The physical appearance of the vulva in ureaplasma infected ewes. **Veterinary Research Communications**, v. 9, n. 2, p. 123-125, 1985.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H. J. Ureaplasmas in ewes. **The Veterinary Record**, v. 112, n. 30, p. 441, 1983.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H. J. Ureaplasmas in sheep. **The Veterinary Record**, v. 105, n.22/29, p. 576-577, 1979.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H.; IRWIN, D. Ureaplasma spp isolated from ewes in Northern Ireland. **The Veterinary Record**, v. 104, n. 17, p. 397-398, 1979.

METTIFOGO, E. **Diagnóstico de micoplasmas aviários pela reação em cadeia da polimerase multiplex e tipificação genômica com primers arbitrários e eletroforese de campo pulsado de cepas de *Mycoplasma gallisepticum***. 2003. 196 p. Tese. (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MILES, R.; NICHOLAS, R. Mycoplasma protocols: introduction. **Methods in Molecular Biology**, v. 104, p. 01-05, 1998.

MOSS, T. J. M.; NITSOS, I.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H.; NEWNHAM, J. P. Experimental intrauterine *Ureaplasma* infection in sheep. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, n. 4, p. 1179-1186, 2004.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase

catalysed reaction. **Methods Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NAGLIC, T.; HOTZEL, H.; BALL, H. J.; SEOL, B.; BUSCH, K. Studies on the etiology of caprine mycoplasmosis in Croatia. In: **MYCOPLASMAS of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics**, 2001. v. 5, p. 137-140.

NICHOLAS, R. A. J.; GREIG, A.; BAKER, S. E.; AYLING, R. D.; HELDTANDER, M.; JOHANSSON, K. E.; HOUSHAYMI, B. M. Isolation of *Mycoplasma fermentans* from sheep. **The Veterinary Record**, v. 142, n. 28, p. 220-221, 1998.

NICHOLAS, R. A. J.; HANNAN, D. A. R.; BAKER, S. E.; WEAVER, C. R.; TERLAAK, E. A. *Mycoplasma canis* in British calf. **The Veterinary Record**, v. 137, n. 17, p. 443-444, 1995.

NICHOLAS, R. A. J.; KHAN, L. A.; HOUSHAYMI, B.; MILES, R. J.; AYLING, R. D.; HOTZEL, H.; SACHSE, K. Close genetic and phenotypic relatedness between *Mycoplasma* ovine/caprine serogroup 11 and *Mycoplasma bovis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 396 - 402, 2002.

NICHOLAS, R. A. J.; WESSELS, M.; ORME, P. K.; WOOD, E.; SACHSE, K. Isolation of *Mycoplasma* ovine/caprine serogroup 11 from infertile sheep in Britain. **The Veterinary Record**, v. 145, n. 9, p. 434-435, 1999.

NICOLSON, G. L.; NASRALIA, M. Y.; NICOLSON, N. L. The pathogenesis and treatment of mycoplasmal infectious. **Antimicrob. Infect. Dis. News.**, v. 17, n. 11, p. 81-88, 1999.

PROGRAMA NACIONAL DE SANIDADE DOS CAPRINOS E OVINOS – PNSCO. Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/PNSCO>>. Acesso em: 14 nov. 2005.

PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**, São Paulo: Roca, 2005. cap. 6, p. 206.

RANA, J. S.; GUPTA, P. P.; BANGA, H. S. Pathology of genital tract of goats experimentally infected with *Mycoplasma* serogroup 11. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 63, n. 7, p. 706-709, 1993.

RAZIN, S. Molecular properties of *Mollicutes*: a synopsis. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasma**. California: Academic Press, v. 1, p. 33-40, 1995.

RAZIN, S.; HYMAN, H. C.; YOGEV, D. DNA probes for detection and identification of mycoplasmas (*MOLLICUTES*). **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 23, n. 6, p. 735-741, 1987.

RAZIN, S.; JACOBS, E. *Mycoplasma* adhesion. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 407-422, 1992.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. Mycoplasma characterization. In: METHODS in mycoplasmaology. New York: Academic Press, 1983. v.1, p. 504.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasma. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

REID, S. W.; MADILL, D. G.; VREUGDENHIL, A. H. Ureaplasma vulvovaginitis and infertility in eight southern Ontario dairy herds. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 30, n. 3, p. 255, 1989.

ROBERTS, R. S.; BOLTON, J. F. A venereal diseases of sheep. **The Veterinary Record**, v. 57, n. 52, p. 686-687, 1945.

RODRÍGUEZ, J. L.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; HERRÁEZ, P.; POVEDA, J. B.; FERNÁNDEZ, A. Isolation of *Mycoplasma mycoides*, *mycoides* (LC variant), from two naturally aborted caprine fetuses. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 1003-1009, 1995.

RODRIGUEZ, J. L.; GUTIERREZ, C.; BROOKS, D. L.; DAMASSA, A. J.; OROS, J.; FERNANDEZ, A. A pathological and immunohistochemical study of goat kids undergoing septicaemic disease caused by *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type). **Zentralblatt für Veterinärmedizin B**. v. 45, n. 3, p.141-149, 1998.

ROSENDAL, S. Ovine and caprine mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; IAURERMAN, L. H., **Mycoplasmas in animals: laboratory diagnosis**. Ames: Iowa States University Press, Ames. 1994, p. 84-92.

ROSENDAL, S.; ERNØ, H.; WYAND, D. S. *Mycoplasma mycoides* subespécie *mycoides* as a cause of polyarthritis in goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 175, p. 379-379, 1979.

RUFFIN, D. C. Mycoplasma infections in small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 2, p. 315-332, 2001.

RUHNKE, H. L.; DOIG, P. A.; MACKAY, A. L.; GAGNON, A.; KIERSTEAD, M. Isolation of *Ureaplasma* from bovine granular vulvitis. **Canadian Journal Comparative Medicine**, v. 42, n. 2, p.151-155, 1978.

RUHNKE, H. L.; ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; IAURERMAN, L. H. (Ed.). **Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis**: Ames, Iowa, Iowa State University Press, 1994. p. 141-144.

SANDERSON, M. W.; CHENOWETH, P. J. The role of *Ureaplasma diversum* in bovine reproduction. **Compend Contin Educ Pract Vet**, v. 21, p. S98-S111, 1999.

SHEPARD, M. C.; LUNCEFORD, C. D.; FORD, D. K.; PURCELL, R. H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; RAZIN, S.; BLACK, F. T. *Ureaplasma urealyticum* gen. nov. sp. nov.: proposed nomenclature for the human T (T-strain) mycoplasmas. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 24, p. 160-171, 1974.

SINGH, N.; RAJYA, B. S.; MOHANTY, G. C. Granular vulvovaginitis (GVV) in goats associated with *Mycoplasma agalactiae*. **The Cornell Veterinarian**, v. 64, n. 3, p. 435-442, 1974.

SINGH, N.; RAJYA, B. S.; MOHANTY, G. C. Pathology of *Mycoplasma agalactiae* induced granular vulvovaginitis (GVV) in goats. **The Cornell Veterinarian**, v. 65, n. 3, p. 363-373, 1975.

SWANEPOEL, R.; EFSTRATIOU, S.; BLACKBURN, N. K. *Mycoplasma capricolum* associated with arthritis in sheep. **The Veterinary Record**, v. 22, n. 101, p. 446, 1977.

TAODI, A.; JOHNSON, D. W.; KHEYYALI, D. Pathogenicity of mycoplasma capricolum in sheep after experimental infection. **Veterinary Microbiology**, v. 14, p. 137-144, 1987.

TAYLOR-ROBINSON, R. B.; HAIG, D. A.; WILLIAMS, M. H. Bovine T-strain mycoplasma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 143, n. 1 -2, p. 517-518, 1967.

TIMENETSKY, J.; METTIFOGO, E. O mundo dos micoplasmas: características gerais e patogenicidade, 2002. Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/~bmm/mico>>. Acesso em: 13 mar. 2004

TIWANW, J. S.; SINGH, N. Isolation of *Acholeplasma oculi* from genital lesions in sheep. **The Veterinary Record**, v. 111, n. 30, p. 417, 1982.

TRICHARD, C. J. V.; JORDAAN, P.; PROZESKY, L.; JACOBSZ, E. P.; HENTON, M. M. The identification of *Mycoplasma mycoides mycoides* LC as the aetiological agent of balanoposthitis and vulvovaginitis in sheep in South Africa. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 1, p. 29-37, 1993.

TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**, San Diego, California: Academic Press, 1995. v.1, p. 33-40.

TULLY, J. G.; BARILE, M. F.; RAZIN, S. **The Mycoplasmas I** : cell biology. New York: Academic Press, 1979. p. 31.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN DER LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; UINT, W. G. V.; NIESTER, H. G. M.; GALAMA, J. M. D.; MELCHERS, W. J. G. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S RNA

amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2606-2615, 1993.

WEBB, R. F.; CHICK, B. F. Balanitis and vulvo-vaginitis in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 52, n. 2, p. 241-242, 1976.