



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELE CRISTINA VOLTARELLI

**DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO MOLECULAR DE INFECÇÕES  
GENITAIS EM FÊMEAS BOVINAS OCACIONADAS POR  
*MOLLICUTES* DOS GÊNEROS *MYCOPLASMA* E  
*UREAPLASMA***

---

Londrina  
2014

DANIELE CRISTINA VOLTARELLI

**DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO MOLECULAR DE INFECÇÕES  
GENITAIS EM FÊMEAS BOVINAS OCACIONADAS POR  
*MOLLICUTES* DOS GÊNEROS *MYCOPLASMA* E  
*UREAPLASMA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alice Fernandes Alfieri

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

V935d Voltarelli, Daniele Cristina.

Diagnóstico etiológico molecular de infecções genitais em fêmeas bovinas ocasionadas por *Mollicutes* dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* / Daniele Cristina Voltarelli. – Londrina, 2014.  
76 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Vaca – Aparelho genital – Doenças – Teses. 2. Vulvovaginite – Diagnóstico molecular – Teses. 3. Bovino – Infecções – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.2

DANIELE CRISTINA VOLTARELLI

**DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO MOLECULAR DE INFECÇÕES GENITAIS  
EM FÊMEAS BOVINAS OCASIONADAS POR *MOLLICUTES* DOS  
GÊNEROS *MYCOPLASMA* E *UREAPLASMA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alice Fernandes Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucienne Garcia Pretto Giordano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Márcio Carvalho da Costa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de julho de 2014.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

**1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**

**2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**

**3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**

**4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

VOLTARELLI, Daniele Cristina. **Diagnóstico etiológico molecular de infecções genitais em fêmeas bovinas ocasionadas por *Mollicutes* dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma***. 2014. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

## RESUMO

A vulvovaginite granular (VVG) é uma infecção caracterizada pela presença de secreção, granulações e vesículas nas mucosas vaginal e vulvar descrita em fêmeas bovinas de várias partes do mundo. Bactérias dos gêneros *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum*, que se caracterizam por serem fastidiosos e de difícil diagnóstico, são frequentemente descritos como os principais agentes etiológicos envolvidos nessa infecção. O objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema de diagnóstico molecular, constituído por uma PCR genérica seguida de uma *nested*-PCR, para a identificação de espécies bacterianas da classe *Mollicutes* em material biológico proveniente de animais com VVG. Para a PCR genérica foram desenhados *primers* consensuais degenerados (MolliFw1 / MolliRv1) tendo como alvo uma região conservada denominada espaço intergênico (ITS) e parte dos genes ribossomais 16S e 23S do genoma dos *Mollicutes*. Posteriormente, foram desenhados *primers* internos para reações individuais de *nested*-PCR específica para as espécies de *M. bovis* (MybovisFw2 / MybovisRv2), *M. bovis genitalium* (MygenitFw3 / MygenitRv3) e *U. diversum* (UdivFw4 / UdivRv4). Para determinar a especificidade dos *primers* os produtos amplificados por meio de *nested*-PCR foram submetidos ao sequenciamento e análise da sequência de nucleotídeos. O sistema de diagnóstico desenvolvido foi ainda avaliado frente a 31 amostras de *swabs* vaginais colhidos de vacas com vulvovaginite clínica, provenientes de três rebanhos sendo dois de corte dos estados de Minas Gerais ( $n=12$ ) e Mato Grosso do Sul ( $n=11$ ) e um leiteiro do estado do Paraná ( $n=8$ ). Todas as 31 amostras foram previamente avaliadas quanto a presença de herpesvírus bovino - 1 por meio de *semi nested*-PCR e foram negativas. Em 87,1% (27/31) das amostras avaliadas foram identificados pelo menos um dos micro-organismos investigados. Infecções singulares e mistas ocorreram em 54,8% (17/31) e 32,2% (10/31) das amostras, respectivamente. *U. diversum* foi identificado em 83,8% (26/31) e o *M. bovis genitalium* em 35,4% (11/31) das amostras analisadas. Nenhum dos três rebanhos bovinos incluídos no estudo apresentou infecção singular por *M. bovis*. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem a importância de *U. diversum* e do *M. bovis genitalium* na etiologia da VVG. As taxas de positividade para *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* obtidas foram semelhantes e/ou superiores aos resultados apresentados em estudos que incluíram como métodos de diagnóstico técnicas de cultivo bacteriológico e também reações moleculares como PCR e *nested*-PCR. O sistema molecular de diagnóstico de infecções genitais em fêmeas bovinas ocasionadas por bactérias da classe *Mollicutes* revelou-se como uma alternativa viável, rápida, sensível e específica para o diagnóstico de *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *U. diversum* a partir de material biológico. O diagnóstico precoce dos três principais patógenos bacterianos envolvidos em infecções genitais em vacas com VVG é de grande importância, pois possibilita a implantação de medidas de tratamento, controle e profilaxia mais rápidas e efetivas das infecções.

**Palavras-chave:** Vacas. Vulvovaginite granular. PCR genérica. *Nested*-PCR.

VOLTARELLI, Daniele Cristina. **Molecular etiological diagnosis of genital infections in cows by *Mollicutes* of the genera *Mycoplasma* and *Ureaplasma***. 2014. 76 f. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

### ABSTRACT

Granular vulvovaginitis (GVV) is an infection characterized by the presence of vaginal granular discharge, and vesicles in vaginal and vulvar mucosa described in cows worldwide. Bacteria of the genera *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma diversum* are characterized by being fastidious and difficult to diagnose are frequently described as the main etiological agents involved in this infection. The objective of this study was to develop a molecular diagnostic method, consisting of a generic PCR followed by a nested-PCR for identification of bacterial species of the *Mollicutes* class in biological material obtained from animals with GVV. Degenerate primers were designed for generic consensus PCR (MolliFw1 / MolliRv1) targeting the conserved intergenic spacer region denominated ITS and part of the 16S and 23S ribosomal genes of *Mollicutes*. Subsequently, internal primers were designed for individual nested-PCR reactions specific for the *M. bovis* (MybovisFw2 / MybovisRv2), *M. bovigenitalium* (MygenitFw3 / MygenitRv3) and *U. diversum* (UdivFw4 / UdivRv4) species. To determine the specificity of the primers, the nested-PCR amplified products were subjected to sequencing and nucleotides sequence analysis. The diagnostic system developed was used to screening of 31 vaginal swabs collected from cows with clinical vulvovaginitis from three herds; two beef herds in *Minas Gerais* ( $n=12$ ) and *Mato Grosso do Sul* ( $n=11$ ) and one dairy herd of *Paraná* ( $n=8$ ) state. All 31 samples were negative for the presence of bovine herpesvirus - 1 by semi nested-PCR. At least one of the microorganisms investigated was present in 87.1% (27/31) samples. Single and mixed infections occurred in 54.8% (17/31) and 32.2% (10/31) of sample, respectively. *U. diversum* was identified in 83,8% (26/31) and *M. bovigenitalium* in 35.4% (11/31) of samples. None of the three herds included in the study showed *M. bovis* single infection. The results of this study suggest the importance of *U. diversum* and *M. bovigenitalium* in the etiology of GVV. The positivity rates for *Mycoplasma* spp. and *U. diversum* reported here were similar or higher than the results of previous studies using diagnostic methods such as bacterial culture and molecular techniques including PCR and nested-PCR. The molecular tools for diagnosis of genital infections in cows caused by bacteria of the class *Mollicutes* revealed itself as a reliable, rapid, sensitive and specific alternative for the diagnosis of *M. bovis*, *M. bovigenitalium* and *U. diversum* from biological material. Early diagnosis of the three major bacterial pathogens involved in genital infections in cows with GVV is of major importance, because it enables the implementation of more effective measures of treatment, control and prophylaxis of infections.

**Key Words:** Cow. Granular vulvovaginitis. Generic PCR. Nested-PCR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

### Revisão de literatura

- Figura 1** – Presença de vesículas e hiperemia na parede dorsal lateral da vulva (setas) de animais com vulvovaginite granular (VVG) .....16

### Artigo para publicação

- Figura 2** – Representação esquemática da região denominada espaço intergênico (azul) e dos genes ribossomais 16S e 23S (cinza) presente nos *Mollicutes*.....47
- Figura 3** – Localização dos *primers* externos MolliFw1 / MolliRv1 (preto) desenhados para a amplificação da região espaço intergênico (ITS) e em parte dos genes ribossomais 16S e 23S do genoma dos *Mollicutes* por meio da PCR genérica. ....47
- Figura 4** – Localização dos pares de *primers* internos MybovisFw2 / MybovisRv2, MygenitFw3 / MygenitRv3 e UdivFw4 / UdivRv4 (vermelho) desenhados para a amplificação da região genômica denominada espaço intergênico (ITS) de *M. bovis*, *M. bovigenitalium* e *U. diversum* por meio de *nested* – PCR espécie específica.....48
- Figura 5** – Fotoducação, eletroforese em gel de agarose 2%, dos produtos da *nested*-PCR específica utilizando um par de *primers* interno para cada espécie bacteriana pesquisada. Coluna 1: padrão 123 pb. Colunas 3 e 4: *U. diversum* (isolado clínico / *swab* vaginal). Colunas 6 e 7: *M. bovigenitalium* (isolado clínico / *swab* vaginal). Colunas 9 e 10: *M. bovis* (isolado clínico / *swab* vaginal). Colunas 2, 5 e 8 controle negativo.....67

## LISTA DE TABELAS

---

### Artigo para publicação

- Tabela 1** – Características dos primers genéricos desenhados para a amplificação da região denominada espaço intergênico (ITS) e em parte dos genes ribossomais 16S e 23S presentes nos Mollicutes..... 47
- Tabela 2** – Características dos *primers* desenhados para a amplificação da região espaço intergênico do genoma de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum*. ..... 48
- Tabela 3** – Resultados do diagnóstico de *M. bovis*, *M. bovigenitalium* e *U. diversum* em *swabs* de vacas com vulvovaginite distribuídos de acordo com os rebanhos avaliados e o tipo de infecção (singular ou mista) diagnosticada. .... 52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BoHV-1	Herpesvírus bovino 1
C + G	Citosina + Guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo-trifosfato
FIV	Fecundação de embriões <i>in vitro</i>
VVG	Vulvovaginite Granular
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IL-1	Interleucina – 1
IPV	<i>Infectious Pustular Vulvovaginitis</i> (Vulvovaginite Pustular Infeciosa)
ITS	Espaço Intergênico
<i>M. bovis</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
<i>M. bovis genitalium</i>	<i>Mycoplasma bovis genitalium</i>
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul
N	Número de amostras
NO	Óxido nítrico
Pb	Pares de base
PBS	Tampão salino fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PPLOs	Pleuropneumonia <i>Like Organisms</i>

PR	Paraná
TE	Transferência de embriões
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
<i>U. diversum</i>	<i>Ureaplasma diversum</i>
UV	Ultravioleta

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
1.1	INTRODUÇÃO.....	13
1.2	VULVOVAGINITE.....	15
1.3	VULVOVAGINITE GRANULAR (VVG).....	15
1.3.1	Etiopatogenia / Epidemiologia.....	17
1.3.1.1	Mycoplasma bovis e mycoplasma bovigenitalium.....	20
1.3.1.2	Ureaplasma diversum .....	22
1.3.2	Diagnóstico .....	25
1.3.3	Tratamento, Controle e Profilaxia .....	26
1.4	REFERÊNCIAS .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
2.1	OBJETIVO GERAL .....	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>3</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	43
3.1	DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO MOLECULAR DE INFECÇÕES GENITAIS EM FÊMEAS BOVINAS OCASIONADAS POR MOLLICUTES DOS GÊNEROS MYCOPLASMA E UREAPLASMA .....	43
3.2	INTRODUÇÃO.....	44
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.3.1	Desenho dos Oligonucleotídeos Iniciadores (Primers) .....	46
3.3.2	Amostras Clínicas .....	48
3.3.3	Extração de DNA .....	49
3.3.4	PCR Genérica .....	49
3.3.5	Nested-PCR.....	50
3.3.6	Purificação, Sequenciamento e Análise das Sequências .....	50
3.4	RESULTADOS .....	51
3.4.1	PCR Genérica e Nested-PCR.....	51
3.4.2	Sequenciamento .....	52
3.5	DISCUSSÃO.....	53

3.6	REFERÊNCIAS .....	57
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>64</b>
	APÊNDICE A – Protocolos e técnicas.....	65
	APÊNDICE B – Figura 5 .....	67
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>68</b>
	ANEXO A – Lista de reagentes .....	69
	ANEXO B – Soluções e Tampões .....	72
	ANEXO C – Protocolos e Técnicas.....	74
	ANEXO D – Lista de Softwares .....	80

**1 REVISÃO DE LITERATURA**

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, estimado em mais de 200 milhões de animais, sendo superado apenas pela Índia, onde, em função de aspectos culturais, a produção de carne não assume importância comercial significativa (USDA, 2014). A pecuária representa um dos principais setores do agronegócio brasileiro. Tanto na produção de carne bovina quanto de leite, o país vem apresentando seguidamente taxas recordes de produção e exportação (IBGE, 2013).

De acordo com dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA, 2014), além de ser o segundo maior produtor de carne bovina, desde 2004, o Brasil lidera o *ranking* como o maior exportador de carne bovina do mundo. Embora em índices menores, a pecuária leiteira exibe potencial de expansão, pois anualmente, apresenta aumentos consideráveis na produção. Esses dados expressivos da pecuária bovina evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura no Brasil.

O desempenho reprodutivo dos animais constitui-se num dos fatores de maior importância que afeta a eficiência e a produtividade da pecuária bovina (FORNI; ALBUQUERQUE, 2006; NEVES et al., 2010). Para a obtenção de padrões ideais de eficiência reprodutiva é preciso que ocorra perfeita interação entre fatores fisiológicos, genéticos, nutricionais, ambientais e sanitários (CORRÊA et al., 2000; DOBSON et al., 2007; SARTORI; DODE, 2008).

Diversas biotecnologias direcionadas à reprodução animal têm sido desenvolvidas e aprimoradas no sentido de aumentar a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, maximizar a produção de animais geneticamente superiores. Dentre as principais biotécnicas adotadas no Brasil destacam-se a Inseminação Artificial (IA), Transferência de Embriões (TE), Fecundação *In Vitro* (FIV) e o desenvolvimento de fármacos e protocolos cada vez mais eficientes para a sincronização de cio como, por exemplo, a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Infecções no trato reprodutivo e/ou genital de fêmeas e machos podem comprometer negativamente as taxas e parâmetros utilizados para aferir a eficiência

reprodutiva de rebanhos bovinos que adotam biotécnicas da reprodução (BOLS et al., 1997; AX et al., 2000; SENEDA et al., 2002).

Muitos problemas reprodutivos são causados por diferentes classes de micro-organismos como bactérias, vírus, fungos, protozoários e também por micotoxinas que, de forma direta ou até mesmo indireta, comprometem o trato reprodutivo de fêmeas e machos (NASCIMENTO; SANTOS, 2008).

As principais infecções do trato reprodutivo bovino ocorrem por via hematogena ou então pela via ascendente, por contiguidade de infecções genitais. Em vacas as infecções de origem hematogena comprometem diretamente o concepto, enquanto que as infecções por via ascendente comprometem outras estruturas como cérvix e útero ocasionando cervicite e endometrite, tornando o ambiente uterino inadequado para a manutenção e desenvolvimento embrionário (NASCIMENTO; SANTOS, 2008).

As consequências mais comuns das infecções no trato reprodutivo de fêmeas bovinas são distúrbios na ovulação, infertilidade e mortalidade embrionária, fetal e perinatal (GIVENS; MARLEY, 2008; NASCIMENTO; SANTOS, 2008). Sinais de falhas reprodutivas em um rebanho podem também ser atribuídos a causas não infecciosas, como anormalidades genéticas, intoxicações e traumas físicos, além de causas nutricionais (GIVENS, 2006).

Considerando a importância econômica da bovinocultura de corte e leite no Brasil, assim como os prejuízos financeiros ocasionados por distúrbios infecciosos da reprodução, com o objetivo de garantir maior eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, maior produtividade do rebanho, torna-se necessária a adoção de medidas que visem o controle e, principalmente, a profilaxia dos potenciais patógenos do trato reprodutivo (GIVENS; MARLEY, 2008; NASCIMENTO et al., 2010).

Em todo o mundo, e sobretudo no Brasil, as infecções sistêmicas do trato reprodutivo bovino são pesquisadas com muito mais frequência e intensidade em relação às infecções genitais que, via-de-regra, são negligenciadas. Na sequência, serão abordados alguns aspectos etiológicos, clínicos, epidemiológicos e de diagnóstico de infecções genitais em vacas destacando-se as vulvovaginites.

## 1.2 VULVOVAGINITE

A vagina e a vulva são relativamente resistentes às infecções e essa resistência deve-se, principalmente, ao tipo de epitélio (estratificado pavimentoso) que as reveste, à presença de ácido láctico e à imunidade de mucosa com produção de anticorpos (ACLAND, 1998). As vulvites e vaginites são processos inflamatórios caracterizados por hiperemia, presença de exsudato catarral e histologicamente por infiltrado inflamatório linfocitário (NASCIMENTO; SANTOS, 2008). Essas inflamações podem ocorrer em consequência de situações adversas destacando-se: i) partos distócicos; ii) traumas; iii) causas infecciosas e/ou de transmissão venérea; iv) causas inespecíficas; v) em associação a outros processos inflamatórios do trato genital como cérvix e útero; vi) causas iatrogênicas (GRUNERT et al., 2005).

Apesar da característica multifatorial das vulvovaginites bovinas destacam-se ainda aquelas ocasionadas por infecções genitais, alguns micro-organismos podem ser responsáveis diretos por infecções da vulva, vestibulo, vagina e cérvix. Entre os principais agentes etiológicos de vulvovaginites na espécie bovina destacam-se o *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), *Mycoplasma bovigenitalium* (*M. bovigenitalium*) e *Ureaplasma diversum* (*U. diversum*) que são associados ao quadro clínico denominado Vulvovaginite Granular (VVG) e o herpesvírus bovino-1 (BoHV-1), agente etiológico da Vulvovaginite Pustular Infecciosa (*Infectious Pustular Vulvovaginitis* – IPV) (GRUNERT et al., 2005).

## 1.3 VULVOVAGINITE GRANULAR (VVG)

A VVG dos bovinos é a inflamação da vagina e da vulva. Na fase aguda a infecção é caracterizada clinicamente por hiperemia da mucosa, secreção vulvar mucopurulenta profusa e presença de grânulos elevados de 1 a 2 mm de diâmetro, conforme apresentado na figura 1 (ACLAND, 1998). Os nódulos são visíveis 5 a 7 dias após a infecção. A doença pode torna-se crônica e as lesões desaparecem em aproximadamente três meses. Cerca de 10% dos animais infectados podem apresentar vesículas de 2 a 5 mm na parede dorsal lateral da vulva. Embora a denominação vulvovaginite granular, possa até ser incorreta sob o ponto de vista anatomopatológico, pois sugere um processo inflamatório granulomatoso, histologicamente os nódulos correspondem a áreas de acúmulo de linfócitos e plasmócitos (FOSTER, 2007; SCOTT et al., 2011). Em consequência da

inflamação pode ocorrer cervicite, salpingite, endometrite, infertilidade, repetição de cio, morte embrionária e fetal (DOIG et al., 1980a; GIVENS; MARLEY, 2008; GHANEM et al., 2013).

**Figura 1** — Presença de vesículas e hiperemia na parede dorsal lateral da vulva (setas) de animais com vulvovaginite granular (VVG)



**Fonte:** Próprio autor

Os episódios clínicos de VVG bem como as suas consequências podem ser facilmente confundidas com IPV que é uma infecção viral ocasionada por BoHV-1 (KIRKBRIDE, 1987). A IPV aguda pode se desenvolver no trato genital de fêmeas entre 2 a 4 dias após a monta natural ou inseminação artificial com sêmen contaminado. Clinicamente, os sinais da infecção viral são observados após o período de incubação que varia de 1 a 3 dias e caracterizam-se pelo aparecimento de hiperemia, corrimento genital, que varia de seromucoso a mucopurulento, e edemaciação da vulva. Pequenas pústulas distribuídas na mucosa podem coalescer formando úlceras recobertas por material fibrinoso que ocupam grande parte da superfície vulvar (HENZEL et al., 2008). Histologicamente, na IPV observa-se necrose do epitélio e presença de corpúsculos de inclusão intranucleares (SCOTT et al., 2011).

A VVG, ocasionada tanto por *M. bovis*, *M. bovigentialium* quanto por *U. diversum*, produz maior volume de material mucopurulento do que a IPV e as lesões teciduais são mais salientes e produtivas. Entretanto, apenas essas características não são suficientes para a realização de diagnóstico clínico uma vez

que é extremamente difícil distinguir a VVG e a IPV apenas com base em sinais clínicos (KIRKBRIDE, 1987).

### 1.3.1 Etiopatogenia / Epidemiologia

O cultivo de micoplasma foi descrito pela primeira vez por Edmond Nocard e Emile Roux em 1898, em tecidos de bovinos com pleuropneumonia e artrite, assim estes agentes foram denominados “Pleuropneumonia *Like Organisms*” (PPLOs). A natureza dos micoplasmas tem representado um desafio na compreensão da sua biologia, classificação e taxonomia. Devido ao seu tamanho pequeno e capacidade de transpor filtros que bloqueavam a passagem de bactérias, estes micro-organismos foram considerados vírus por muitos anos. No entanto, eles cresciam em meios de cultura como as bactérias e foram confundidos com as formas - L - bacterianas até o final dos anos 60 (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

A simplicidade estrutural e tamanho pequeno do genoma dos micoplasmas levou Morowitz e Wallace (1973) a proporem que micoplasmas são os organismos mais primitivos existentes e, que devem ser colocados na raiz da árvore filogenética. Somente com a introdução de dados obtidos do sequenciamento do rRNA, Woese et al. (1980), sustentaram a hipótese de que os micoplasmas surgiram da evolução degenerativa de bactérias Gram positivas, mais especificamente dos clostrídios. O nome micoplasma foi utilizado para denominar os micro-organismos da classe *Mollicutes*, mas sugeriu-se o uso do termo mollicutes como nome trivial, para designar qualquer micro-organismo dessa classe. O termo micoplasma refere-se atualmente apenas aos membros do gênero *Mycoplasma* (WALKER, 2003).

Os gêneros *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. pertencem à classe *Mollicutes*, que é composta por cinco ordens, seis famílias e 14 gêneros. Várias espécies de *Mycoplasma* já foram isoladas de bovinos, ocasionando infecções respiratórias, urogenitais, articulares, mamárias, conjuntivais e neurológicas. Entretanto, *M. bovis* e *M. bovis genitalium* são consideradas patogênicas para o trato reprodutivo, respiratório e mamário de bovino. No gênero *Ureaplasma* apenas o *U. diversum* foi isolado de desordens reprodutivas em bovinos (KIRKBRIDE, 1987; NICOLET, 1996; RAZIN et al., 1998). Os membros da classe *Mollicutes* infectam grande variedade de espécies animais e são considerados

cosmopolitas podendo ser encontrados como comensais ou patógenos do trato respiratório superior e trato urogenital inferior de bovinos (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Por muito tempo *M. bovis*, *M. bovigentialium* e *U. diversum* foram considerados comensais e não patogênicos para o trato genital de bovinos. Posteriormente, esses agentes foram associados a quadros clínicos de VVG e com isso, assumiram importância em termos de sanidade animal. (RUHNKE et al., 1978; DOIG et al., 1979; SANTOS et al., 2013).

Os *Mollicutes* são os menores procariontes de vida livre e caracterizam-se por serem desprovidos de parede celular, possuem apenas a membrana celular com esteróis como único envoltório, e serem constituídos por genoma pequeno, comparado com outras bactérias, e com menor proporção de C + G (citosina e guanina). São bactérias pleomórficas, variando de esféricas até espiral e filamentosas. As colônias típicas são pequenas (0,01 a 1 mm) apresentando aparência característica de “ovo frito” (NEIMARK, 1986; RAZIN, 1992).

Os *Mollicutes* apresentam resistência a substâncias antimicrobianas que afetam a parede celular e sua síntese, mas são sensíveis a compostos que interferem na síntese protéicas e de ácidos nucleicos. Em geral, as bactérias sobrevivem fora do hospedeiro por períodos substanciais em ambientes úmidos e frios, no entanto, são bastante suscetíveis ao calor, a alterações de pH e a maioria dos detergentes e desinfetantes (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

*Ureaplasmas* diferenciam-se de outros *Mollicutes* por necessitarem da ureia para o seu crescimento e também por não conter ácidos graxos em sua estrutura, apresentam ainda características de não suportarem alcalinização *in vitro*, ocasionada pela hidrólise da ureia no meio de cultura. Esta característica é o principal aspecto responsável pela dificuldade no desenvolvimento e evolução dos estudos com relação a esse gênero de *Mollicutes*. O *U. diversum* é sub-classificado como grupo A, B ou C, por apresentar heterogeneidade sorológica (RAZIN; TULLY, 1983; TRUSCOTT, 1983).

O processo de virulência dos *Mollicutes* pode ser complexo e variado, pois é esclarecido em algumas espécies, mas desconhecido em outras. As células do hospedeiro fornecem os substratos necessários para o desenvolvimento microbiano, disponibilizando os precursores de lipídios, purinas e pirimidinas pré-formadas (TRYON; BASEMAN, 1992). Nos mamíferos, usualmente, os *Mollicutes* preferem as células mesenquimatosas que revestem a cavidade serosa das

articulações e membranas dos sistemas respiratório, digestório e urogenital, o que permite considerá-los patógenos de superfície (RAZIN; TULLY, 1983; HOWARD, 1984).

Nas infecções, o mecanismo de destruição das células eucariotas se inicia pela aderência, invasão ou fusão dos *Mollicutes* com as células hospedeiras. Durante a replicação celular, dependendo da espécie de *Mollicutes*, são liberados metabólitos como peróxido de hidrogênio, amônia, lipases, proteases e nucleases. Considerando que os *Mollicutes* são micro-organismos de crescimento lento, a infecção pode não conduzir à destruição celular, porém a célula pode entrar em um processo de estresse metabólico, a ponto de aumentar a sua vulnerabilidade frente a outras infecções (TRYON; BASEMAN, 1992).

Algumas espécies de *Mollicutes* são capazes de mimetizarem ou modularem a resposta imune inata e adquirida do hospedeiro ocasionando uma série de reações imunológicas que conduzem a alterações patológicas (NICOLET, 1986). *In vivo*, usualmente esses micro-organismos se aderem à superfície celular por meio de adesinas, sendo que algumas espécies possuem estruturas polares especializadas para esta propriedade (MUTO; USHIDA, 2002).

O principal reservatório para os *Mollicutes* é o hospedeiro infectado. Animais assintomáticos infectados transportam organismos nas superfícies mucosas incluindo mucosa nasal, conjuntival, oral, intestinal e genital (WALKER, 2003). As vias de eliminação de *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *U. diversum* são secreções orgânicas, especialmente sêmen, mucos prepucial e vaginal, secreção conjuntival, nasal e leite. A transmissão ocorre por contágio indireto, por meio de equipamentos contaminados como pipetas de inseminação e teteiras de ordenhadeiras mecânicas. No entanto, as principais formas de transmissão são contágio direto pelo coito, em que touros infectados disseminam os agentes por meio da monta natural ou sêmen contaminado (KIRBRIDE, 1987; BRITTON et al., 1988a; MILLER et al., 1994). *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* têm distribuição mundial e podem ser disseminados por meio do comércio internacional de animais, sêmen industrializado e, mais recentemente, por produtos de transferência de embriões (BRITTON et al., 1988b; BIELANSKI et al., 2000; BUZINHANI et al., 2011).

A ocorrência de VVG e os distúrbios reprodutivos que ela ocasiona já foram descritas em rebanhos bovinos de vários países como, por exemplo, Canadá (DOIG et al., 1979), Costa Rica (LEÓN et al., 1995), Áustria (PETIT et al.,

2008), Israel (LYSNYANSKY et al., 2009), Índia (CHANDRA et al., 2010), Itália (TRAMUTA et al., 2011), Austrália (SMITH et al., 2012; ARGUE et al., 2013) e Japão (GHANEM et al., 2013). No Brasil a infecção já foi relatada nos estados de São Paulo (CARDOSO et al., 2000a), Minas Gerais (NASCIMENTO et al., 2005), Alagoas (OLIVEIRA FILHO et al., 2005), Goiás, Santa Catarina (BUZINHANI et al., 2007; GAMBARINI et al., 2009), Paraíba (SANTOS et al., 2013), Bahia (MARQUES et al., 2013) e recentemente no Mato Grosso (GAETI et al., 2014). Entretanto, estudos na região norte do Paraná permanecem por ser realizados.

### 1.3.1.1 Mycoplasma bovis e Mycoplasma bovis genitalium

*M. bovis* foi isolado em bovinos pela primeira vez em 1961 nos Estados Unidos de um caso de mastite severa em vaca leiteira (HALE et al., 1962). *M. bovis* é um patógeno reconhecido para a espécie bovina podendo causar endometrite, salpingite, ooforite, abortamento e vesiculite seminal. É também um importante agente etiológico de mastite, otite, artrite e pneumonia (RUHNKE; ROSENDAL, 1994). Hirth et al. (1966) observaram que 10 de 12 novilhas inseminadas com sêmen contaminado com *M. bovis*, apresentaram vários episódios de repetição de cio e à necropsia, em 4 de 8 animais, foram observados graus variados de salpingite supurativa crônica, endometrite crônica e adesão ovariana.

*M. bovis* pode ser introduzido em rebanhos livres da doença pela aquisição de animais portadores (PFÜTZNER; SACHSE, 1996). O micro-organismo pode permanecer viável no sêmen de touros congelados em nitrogênio líquido, por até 18 meses mantendo a capacidade de ocasionar lesões no sistema reprodutor de fêmeas (HIRTH et al., 1966; DOIG, 1981). Experimentalmente, o *M. bovis* pode causar aborto quando inoculado no fluido amniótico, tendo sido isolado de fetos abortados, do útero e do muco cervical de vacas inférteis (LANGFORD, 1975; PANANGALA et al., 1978).

O *M. bovis genitalium* é considerado um dos patógenos de maior importância para o trato genital de bovinos. A presença dessa bactéria está associada a patologias do sistema reprodutor como VVG, infertilidade, endometrite, vesiculite seminal e baixa motilidade espermática (RUHNKE; ROSENDAL, 1994). *M. bovis genitalium* pode ainda ser considerado comensal do trato genital, podendo ser introduzido no útero por meio da inseminação artificial ou monta natural e causar

endometrite, interferindo com a implantação do embrião ou mesmo resultando em sua morte (MILLER et al., 1994).

Afshar et al. (1966) descreveram pela primeira vez a associação do *M. bovigentialium* com quadros clínicos de VVG. Entretanto, os autores relataram que a doença somente foi reproduzida de forma consistente nos casos em que o epitélio vulvovaginal foi levemente escarificado antes da inoculação da bactéria. Posteriormente, Ruhnke et al. (1978) isolaram, ainda que em baixa frequência, *M. bovigentialium* em casos naturais de VVG. Nesse mesmo estudo houve maior associação entre a infecção natural e o isolamento do *U. diversum*. Estudos realizados na década de 70 no Canadá, utilizando como técnica de diagnóstico o cultivo bacteriano a partir de amostras do trato reprodutivo de vacas inférteis e de um feto abortado, demonstraram a presença de *M. bovigentialium* tanto em secreções vaginais quanto nos cotilédones de útero grávidico e no tecido renal do feto (LANGFORD, 1975).

Com o objetivo de investigar um surto com suspeita clínica de IPV em um rebanho de Israel que apresentava vulvovaginite granular e outras desordens reprodutivas, Lysnyansky et al. (2009) identificaram *M. bovigentialium* em 11 de 20 amostras de *swab* vaginal e associaram o micro-organismo ao surto de VVG uma vez que o BoHV-1 não foi identificado em nenhuma amostra clínica. Em um estudo recente realizado no Japão, foi demonstrado que a infecção uterina por *M. bovigentialium* pode estar associada à distocia e endometrite no pós-parto em vacas leiteiras (GHANEM et al., 2013).

Petit et al. (2008), estudando a prevalência de infecções por *Mollicutes* em bovinos leiteiros na Austrália, verificaram correlação significativamente superior (12,5%) entre o número de animais que havia abortado no período de um ano, com aqueles que foram positivos para *M. bovigentialium*, em relação ao número de animais sem qualquer histórico de aborto que também foram positivos para o agente. No Brasil, Buzinhani et al. (2007) avaliaram 112 amostras de muco vaginal coletadas de vacas com distúrbios reprodutivos das quais 9,8% foram positivas na reação em cadeia pela polimerase (PCR) para *M. bovis* e 37,5% na *nested*-PCR para *U. diversum*.

Em estudos conduzidos por Kreusel et al. (1988), espécies de *M. bovis* e *M. bovigentialium* empregadas em infecções experimentais pela via intraprepucial foram re-isoladas em sete de oito touros, nos quais foram observadas

lesões inflamatórias brandas em dois animais. Sprecher et al. (1999), analisando amostras de sêmen de 100 touros, observaram que a maioria (94%) das amostras continha um ou mais agentes patogênicos para o trato reprodutor incluindo o *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e o *U. diversum* demonstrando que o sêmen pode ser fonte de contaminação e disseminação da doença.

Bielanski et al. (2000) relataram que a suplementação em meios de cultivo com antibióticos e a lavagem dos embriões de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), não são eficazes para eliminar o *M. bovis* e *M. bovis genitalium* e que ambos os micro-organismos podem ser transmitidos através da fecundação *in vitro*, devido a sua capacidade de aderir à membrana do espermatozoide e à zona pelúcida dos embriões. Em estudo recente realizado no Brasil, com o objetivo de avaliar a interação *in vitro* do *M. bovis genitalium* com as células do *cumulus*, Goes et al. (2012) demonstraram que a contaminação por *Mycoplasma* pode ser imperceptível às manipulações da FIV, uma vez que as células infectadas com este micro-organismo não ocasionam turvação no meio de cultura.

#### 1.3.1.2 Ureaplasma diversum

Esta espécie, assim como as espécies do gênero *Mycoplasma* spp. é considerada um patógeno de grande importância, por ocasionar distúrbios reprodutivos em bovinos como vulvovaginite granular, infertilidade, endometrite, salpingite, cervicite, perda embrionária, abortos e, nos machos, vesiculite seminal, balanopostite, epididimite e alterações espermáticas (DOIG et al., 1980a; RAE et al., 1993; CHELMONSKA-SOYTA et al., 2001).

O *U. diversum* foi isolado pela primeira vez em 1967 do trato urogenital de vacas aparentemente saudáveis. Portanto, o micro-organismo foi inicialmente considerado como agente não patogênico por pertencer a microbiota normal (TAYLOR-ROBINSON et al., 1967). Posteriormente, Doig et al. (1980b), em um estudo experimental com inoculação vulvar, reproduziram quadros de VVG bovina e confirmaram a importância deste micro-organismo para o trato reprodutivo bovino.

Rae et al. (1993) verificaram forte associação entre a presença de *U. diversum* e lesões vaginais, no entanto, não houve associação entre a gravidade das

lesões vaginais e a atividade ovariana. Com isso, os autores acreditam que *U. diversum* está relacionado com o processo de infertilidade, mas o papel deste micro-organismo nesta enfermidade ainda não foi esclarecido. Segundo Kreplin et al. (1987) a fertilidade bovina pode ser comprometida pela infecção com *Ureaplasma*. Sanderson et al. (2000) observaram que vacas negativas para *U. diversum* tiveram maior facilidade de fertilização do que as que apresentaram cultura positiva para esse micro-organismo. Surto de infertilidade podem ou não estar associados com evidências clínicas de vulvovaginite, porém quando a fase aguda da doença predomina no rebanho, pode-se observar redução considerável da fertilidade (OLIVEIRA FILHO et al., 2005).

A inoculação do *U. diversum* na vulva e cérvix não produz lesões no útero ou oviduto, mas inoculações intrauterinas resultam em salpingite e endometrite. As lesões produzidas não são tão graves quanto as causadas pelo *M. bovis*, mas a infecção pode resultar em um ambiente desfavorável para o embrião. Morte embrionária com retorno ao cio, frequentemente acompanhada de secreção vulvar purulenta pode ocorrer após a inseminação de fêmeas com VVG (DOIG et al., 1980a). No entanto, Chelmonska-soyta et al. (1994, 2001) observaram que o *U. diversum* estimula interleucina - 1 (IL-1), fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico (NO) em leucócitos mononucleares, mais não impede o desenvolvimento embrionário e a formação do blastocisto.

Experimentalmente, o *U. diversum* não causa alterações estruturais em mórulas bovinas (BRITTON et al., 1987). Entretanto, o micro-organismo foi identificado na superfície externa da zona pelúcida, podendo ser transmitido durante a transferência de embrião (BRITTON et al., 1988a; 1988b). Smits et al. (1994) sugeriram que o *U. diversum* altera a integridade de células do oviduto, contribuindo para a deficiência de implantação e desenvolvimento do embrião bovino. Quando o *U. diversum* cresce em células do oviduto ocorre a ciliase, desciliação e descamação do epitélio (STALHEIM et al., 1976).

A potente atividade de hidrólise da ureia pela urease, com liberação de amônia, pode ser considerada um fator de virulência dos *Ureaplasmas*, provavelmente afetando o tecido adjacente ao local da infecção. Outro fator de virulência é a redução significativa da prostaglandina E<sub>2</sub> e F<sub>2 $\alpha$</sub> , pelas células do endométrio, após a infecção pelo *U. diversum*. As prostaglandinas são necessárias para a implantação e manutenção da gestação (KIM et al., 1994) e os ureaplasmas

são capazes de alterar este contexto, provavelmente pela atividade da fosfolipase A (LAMONT et al., 1990). Esta enzima pode liberar quantidade excessiva de ácido araquidônico, resultando na inibição dos substratos para a síntese da prostaglandina (CASSELL et al., 1993).

Mulira et al. (1992) observaram a presença de *U. diversum* em 43,3% de vacas leiteiras e em 27,1% de vacas de corte. Além disso, os autores verificaram que o isolamento deste mollicute em fêmeas que apresentaram lesão vulvar foi duas vezes superior aos isolamentos realizados em fêmeas saudáveis. Petit et al. (2008) isolaram esse micro-organismo em 36% dos swabs vaginais de vacas com e sem distúrbios reprodutivos, sendo que esta bactéria foi isolada em 2,6% (8/17) das vacas que apresentavam vaginite.

No Brasil, o primeiro registro da presença de *U. diversum* em bovinos foi realizado por Cardoso et al. (1997). Cardoso et al. (2000b) também isolaram *U. diversum* em 38,8% (59/152) das amostras de muco vulvovaginal de vacas apresentando vulvovaginite e distúrbios reprodutivos, evidenciando a importância do diagnóstico laboratorial desse micro-organismo no Brasil. Os autores relataram ainda que animais da raça Holandesa apresentaram menor frequência de infecção quando comparados com animais das raças Nelore e Jersey, sugerindo maior resistência da raça Holandesa.

Nulíparas e primíparas apresentam risco de adquirir a infecção 2,99 vezes maior do que as múltiplas, independentemente da raça. As infecções ocorrem com maior frequência no inverno, quando comparadas ao verão, ocasionando a transmissão direta em rebanhos contaminados (LEÓN et al., 1995). A transmissão venérea de touros infectados é importante na disseminação da doença, não podendo ser descartada a transmissão indireta por fômites (DOIG, 1981).

*U. diversum* está envolvido em casos de vesiculite seminal, balanopostite, epididimite (PILASZEK; TRUSZCZYNSKI, 1988) e em alterações morfológicas e funcionais nos espermatozoides (PANANGALA et al., 1981; EAGLESOME et al., 1992). *U. diversum* coloniza o prepúcio e a porção distal da uretra de touros e foi isolado da ampola e vesícula seminal (FISH et al., 1985). A cavidade prepucial pode ser o principal ponto de contaminação do sêmen quando a colheita é feita através de vagina artificial. Entretanto, demonstrou-se que a uretra também pode ser colonizada por esta bactéria, sugerindo que os procedimentos

instituídos para reduzir o número de micro-organismos no prepúcio podem não ser totalmente efetivos na prevenção da contaminação do sêmen (DOIG, 1981).

Mulira et al. (1992) observaram que 47,2% dos touros leiteiros e 67,6% dos touros de corte apresentaram *U. diversum* no trato reprodutivo. A aderência dos micro-organismos interfere na espermatogênese, transporte espermático, capacitação e fecundação. Os espermatozoides podem atuar na transmissão dos agentes, pois os antibióticos, rotineiramente utilizados nas centrais de inseminação, não eliminam *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (RAE et al., 1995). *U. diversum* é capaz de produzir placentite grave e, por multiplicar-se no feto, alveolite fetal, que pode resultar em aborto ou mesmo nascimento de bezerros fracos. Em rebanhos infectados os abortos podem ser esporádicos e ocorrerem em qualquer período gestacional. A infecção apresenta-se de forma crônica e o micro-organismo pode ser eliminado pela urina e por descarga vulvar após a expulsão fetal (HOWARD et al., 1973; MILLER et al., 1983; RUHNKE et al., 1984).

### 1.3.2 Diagnóstico

Os métodos utilizados para a detecção de *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* estão restritos às técnicas de isolamento e identificação sorológica. No entanto, estes procedimentos são demorados, de difícil padronização e dispendiosos (SIMECKA et al., 1992; VAN KUPPEVELD et al., 1992). Apesar do isolamento ser o método de eleição, pois possibilita a visualização dos micro-organismos, o método pode ser comprometido pela presença de bactérias contaminantes, usualmente presentes quando as colheitas de material biológico para diagnóstico são realizadas a campo. O período de tempo transcorrido entre a colheita da amostra clínica e o processamento laboratorial também pode comprometer a viabilidade dos micro-organismos, o que prejudica a técnica de isolamento ou cultivo em meios artificiais. Estes fatores têm determinado a implementação de técnicas mais rápidas, sensíveis e específicas (CARDOSO et al., 2000b).

As técnicas moleculares, como a PCR, têm sido um grande avanço para o diagnóstico das micoplasmoses, pois além de detectarem cepas inviáveis para o isolamento, requerem pequenas quantidades de DNA presentes na amostra clínica a ser analisada (ANDRADE, 1993; GHADERSOHI et al., 1997). A PCR é de grande utilidade para o diagnóstico das micoplasmoses, pois detectam células

viáveis ou inviáveis, em menor tempo. Estas características agilizam o diagnóstico laboratorial, possibilitando ao clínico de campo a rápida implantação de estratégias mais eficazes para o controle e profilaxia da infecção no rebanho (CARDOSO; VASCONCELLOS, 2004).

### 1.3.3 Tratamento, Controle E Profilaxia

As formas de controle indicadas para as micoplasmoses reprodutivas são as terapias com antibióticos local, preventiva para as infecções genitais nas fêmeas, e sistêmica, para os casos de infecções em machos. A ausência de parede celular, característica dos *Mollicutes*, indica a utilização de antibióticos cuja ação seja sobre a síntese proteica. As drogas preconizadas são: o tartarato de tilosina, a oxitetraciclina e o fumarato de tiamulin (TRUSCOTT et al., 1975; HOLZMANN et al., 1984; PICARD et al., 1984; STIPKOVITS et al., 1984).

A ausência de recursos imunoprofiláticos efetivos contra as micoplasmoses genitais determina que o controle destas enfermidades dependa de medidas de higiene e de procedimentos sanitários, incluindo a segregação de animais infectados (PATHAK; GARG, 1988). Após a implantação destas medidas, procedimentos que contribuem para minimizar a transmissão dos micro-organismos também devem ser adotados. O uso de pipetas de inseminação artificial com bacia e/ou camisa sanitária, assim como lavagem, limpeza e desinfecção de implantes hormonais utilizados nas técnicas de reprodução têm sido preconizados (EAGLESOME et al., 1992).

## 1.4 REFERÊNCIAS

ACLAND, H.M. Sistema reprodutor da fêmea. In: CARLTON, W.W.; MCGAVIN, D.M. Patologia Veterinária Especial de Thomson, 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. p. 541-572.

AFSHAR, A.; STUART, P.; HUCK, R.A. Granular vulvovaginitis (Nodular Venereal Disease) of cattle associated with *Mycoplasma bovis*. Veterinary Record, v. 87, p. 512-519, 1966.

ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. Revista Associação Médica Brasileira, v. 39, p. 175-186, 1993.

ARGUE, B.; CHOUSALKARB, A.K.K.; CHENOWETHA, P.J. Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population. Australian Veterinary Journal, v. 91, n. 3, p. 99-101, 2013.

AX, R.L.; DALLY, M.R.; DIDON, B.A.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, E. Artificial insemination. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Reproduction in Farm Animals, 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 376-389.

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

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel an aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact Cumulus oocyte complexes. Theriogenology, v. 47, n. 6, p. 1221-1236, 1997.

BRITTON, A.P.; RUHNKE, H.L.; MILLER, R.B.; JOHNSON, W.H.; LESLIE, K.E.; ROSENDAL, S. In vitro exposure of bovine morulae to *Ureaplasma diversum*. Canadian Journal of Veterinary Research, v. 51, n. 2, p. 198-203, 1987.

BRITTON, A.P.; MILLER, R.B.; RUHNKE, H.L.; JOHNSON, W.H. The recovery of ureaplasmas from bovine embryos following in vitro exposure and ten washes. Theriogenology, v. 30, n. 5, p. 997-1003, 1988a.

BRITTON, A.P.; RUHNKE, H.L.; MILLER, R.B.; JOHNSON, W.H. Adherence of *ureaplasma diversum* to the bovine zona pellucida. Theriogenology, v. 29, n. 1, p. 229, 1988b.

BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n. 6, p. 1368-1375, 2007.

BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R.C.; CORTEZ, B.A.; MARQUES, L.M.; MACHADO-SANTELLI, G.M.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.; TIMENETSKY, J. Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozoids. *BMC Research Notes*, v. 4, n. 1, p. 455, 2011.

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

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

CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L.M.P.S.; TEIXEIRA, S.R.; GENOVEZ, M.E. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers, first report. *Animal Reproduction Science*, v. 63, n. 3, p. 137-143, 2000b.

CARDOSO, M.V.; VASCONCELLOS, S.A. Importância das Micoplasmoses na Fertilidade de Touros. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 2, p. 257-265, 2004.

CASSELL, G.H.; WAITES, K.B.; WATSON, H.L.; CROUSE, D.T.; HARASAWA, R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 6, n. 1, p. 69-87, 1993.

CHANDRA, P.; SINGH, Y.; NAND GARG, D. Occurrence of *Ureaplasma diversum* in cows with various reproductive disorders. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, p. e158, 2010.

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

CHELMONSKA-SOYTA, A.; KATSKA, L.; KURPISZ, M.; STEFANIAK, T.; ZIMECKI, M. The effect of *Ureaplasma diversum* activated mononuclear leukocytes on the

development and interferon-tau production by bovine IVF- derived embryos. *Journal of Reproduction and Immunology*, v. 51, n. 2, p. 145-158, 2001.

CORRÊA, E.S.; ANDRADE, P.; EUCLIDES FILHO, K.; ALVES, R.G.O. Avaliação de um sistema de produção de gado de corte. 1. Desempenho reprodutivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 6, p. 2209-2215, 2000.

DOBSON, H.; SMITH, R.F.; ROYAL, M.D.; KNIGHT, C.H.; SHELDON, I.M. The High-producing Dairy Cow and its Reproductive Performance. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, n. s2, p. 17-23, 2007.

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, 1979.

DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C. Experimental bovine genital ureaplasmosis II. Granular vulvitis, endometritis and salpingitis following uterine inoculation. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 44, n. 3, p. 259, 1980a.

DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C. Experimental bovine genital ureaplasmosis I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 44, p. 252-258. 1980b.

DOIG, P.A. Bovine genital mycoplasmosis. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 22, n. 11, p. 339, 1981.

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

FISH, N.A.; ROSENDAL, S.; MILLER, R.B. The distribution of *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* in the genital tract of normal artificial insemination bulls. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 26, n. 1, p. 13-15, 1985.

FORNI, S.; ALBUQUERQUE, L.G. Avaliação de fatores de ambiente e estimativas de parâmetros genéticos para a característica dias para o parto na raça Nelore1. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 4, p. 1329-1335, 2006.

FOSTER, R.A. Female Reproductive System. In: MCGAVIN, D.M.; ZACHARY, J.F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. p. 1263-1315.

GAETI, J.G.L.; LANA, M.V.; SILVA, G.S.; LERNER, L.; DE CAMPOS, C.G.; HARUNI, F.; COLODEL, E.M.; COSTA, E.F.; CORBELLINI, L.G.; NAKAZATO, L.; PESCADOR, C.A. *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*, p. 1-5, 2014.

GAMBARINI, M.L.; KUNZ, T.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; PORTO, R.N.G.; OLIVEIRA, C.M.G.; BRITO, W.M.E.D.; VIU, M.A.O. Granular Vulvovaginitis Syndrome in Nelore pubertal and post pubertal replacement heifers under tropical conditions: role of *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma diversum* and BHV- 1. *Tropical Animal Health and Production*, v. 41, n. 7, p. 1421-1426, 2009.

GHADERSOHI, A.; COELEN, R.J.; HIRST, R.G. Development of specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 87-98, 1997.

GHANEM, M.E.; HIGUCHI, H.; TEZUKA, E.; DEVKOTA, B.; IZAIKE, Y.; OSAWA, T. *Mycoplasma* infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis. *Theriogenology*, v. 79, n. 1, p. 180-185, 2013.

GIVENS, M.D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, v. 66, n. 3, p. 648-654, 2006.

GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, v. 70, p. 270-285, 2008.

GOES, A.C.; ALVES, M.F.; PAVÃO, D.L.; PICCOLOMINI, M.M.; BATISTA, M.L.; PALAZZI, E.G.; D'ANGELO, M. Interação do *Mycoplasma bovigenitalium* com

células do cumulus in vitro após o período de maturação oocitária bovina. Arquivos Instituto Biológico, v. 79, n. 4, p. 463-467, 2012.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W.G. In: \_\_\_\_\_. Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos: ginecologia. São Paulo: Livraria Varela. 2005. p. 491-521.

HALE, H.H.; HELMBOLDT, C.F.; PLASTRIDGE, W.N.; STULA, E.F. Bovine mastitis caused by a Mycoplasma species. The Cornell Veterinarian, v. 52, p. 582-591, 1962.

HENZEL, A.; DIEL, D.G.; ARENHART, S.; VOGEL, F.S.F.; WEIBELN, R.; FLORES, E.F. Aspectos virológicos e clínico-patológicos da infecção genital aguda e latente pelo herpesvírus bovino tipo 1.2 em bezerras experimentalmente infectadas. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 28, n. 3, p. 140-148, 2008.

HIRTH, R.S.; NIELSEN, S.W.; PLASTRIDGE, W.N. Bovine salpingo-oophoritis produced with semen containing a Mycoplasma. Veterinary Pathology, v. 3, n. 6, p. 616-632, 1966.

HOLZMANN, A.; LABER, G.; GUMHOLD, G. Tiamulin, a new antibiotic for eliminating mycoplasmas from bovine serum: 1. Investigations on Spermatozoal Toxicity. Theriogenology, v. 22, n. 3, p. 237-240, 1984.

HOWARD, C.J.; GOURLAY, R.N.; BROWNLIE, J. The virulence of T-mycoplasmas, isolated from various animal species, assayed by intramammary inoculation in cattle. Journal of Hygiene, v. 71, n. 1, p. 163-170, 1973.

HOWARD, C.J. Animal ureaplasmas: their ecological niche and role in disease. Israel Journal of Medical Sciences, v. 20, n. 10, p. 954-957, 1984.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária. Dez. 2013. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201303\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201303_publ_completa.pdf)>. Acesso em: Jan. 2013.

KIM, J.J.; QUINN, P.A.; FORTIER, M.A. Ureaplasma diversum infection in vitro alters prostaglandin E2 and prostaglandin F2a production by bovine endometrial cells without affecting cell viability. *Infection and Immunity*, v. 62, n. 5, p. 1528-1533, 1994.

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

KREPLIN, C.M.A.; RUHNKE, H.L.; MILLER, R.B.; DOIG, P.A. The effect of intrauterine inoculation with Ureaplasma diversum on bovine fertility. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 51, n. 4, p. 440-443, 1987.

KREUSEL, S.; BOCKLISCH, H.; PFUTZNER, H.; BRYNS, A.; LEIRER, R.; ZIEGENHALS, U. Experimental infections of bulls with Mycoplasma (M.) bovis and M. bovis genitalium. *Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin*, v. 43, n. 5, p. 705-712, 1988.

LAMONT, R.F.; ANTHONY, F.; MYATT, L.; BOOTH, L.; FURR, P.M.; TAYLOR-ROBINSON, D. Production of prostaglandin E2 by human amnion in vitro in response to addition of media conditioned by microorganisms associated with chorioamnionitis and preterm labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 162, n. 3, p. 819-825, 1990.

LANGFORD, E.V. Mycoplasma species recovered from the reproductive tracts of western Canadian cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 39, n. 2, p. 133-137, 1975.

LEÓN, B.A.; CAMPOS, E.; BOLAÑOS, H.; CABALLERO, M. Risk factors for Ureaplasma diversum infections in cattle of a tropical environment. *Revista de Biología Tropical*, v. 43, n. 1-3, p. 21-25, 1995.

LYSNYANSKY, I.; BRENNER, J.; ALPERT, N.; BENJAMIN, A.; BERNSTEIN, M.; ELAD, D.; BLUM, S.; FRIEDGUT, O.; ROTENBERG, O. Identification of Mycoplasma bovis genitalium and Mycoplasma canadense from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. *Veterinary Record*, v. 165, n. 11, p. 319-322, 2009.

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

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, n. 20, p. 367-373, 1983.

MILLER, R.B.; CHELMONSKA-SOYTA, A.; SMITS, B.; FOSTER, R.; ROSENDAL, S. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 10, n. 3, p. 479-490, 1994.

MOROWITZ, H.J.; WALLACE, D.C. Genome Size and Life Cycle of the *Mycoplasma*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 225, n. 1, p. 62-73, 1973.

MULIRA, G.L.; SAUNDERS, J.R.; BARTH, A.D. Isolation of *Ureaplasma diversum* and mycoplasmas from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 33, n. 1, p. 46-49, 1992.

MUTO, A.; USHIDA, C. Transcription and Translation. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. *Molecular Biology and Pathogenesis of Mycoplasmas*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 323-346.

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

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

NASCIMENTO, E.F.; COSTA, L.F.; MOUSTACAS, V.S.; SANTOS, R.L. Doenças da Reprodução de Bovinos de Corte: Programa Preventivo e Controle Sanitário. In: *Simpósio de Produção de Gado de Corte*. 7., Viçosa. Anais... Viçosa: SIMCORTE, 2010. p.17 2010.

NEIMARK, H.C. Origin and evolution of wall-less prokaryotes. In: Madoff S. The bacterial L-Forms, New York: Marcel Dekkar; 1986. p. 21- 42.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 39, n. especial, p. 414-421, 2010.

NICOLET, J. Compêndio de Bacteriologia Veterinária, Zaragoza: Acribia, 1986. p. 275.

NICOLET, J. Animal mycoplasmoses: a general introduction. Revue Scientifique et Technique, v. 15, n. 4, p. 1233-1240, 1996.

OLIVEIRA FILHO, B.D.; PORTO, R.N.G.; GAMBARINI, M.L.; KUNZ, T.L.; FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T.; SOUSA, A.P.F. Isolamento do Ureaplasma diversum em muco vulvovaginal de vacas leiteiras repetidoras de estro no Estado de Alagoas, Brasil. Archives of Veterinary Science, v. 10, n. 2, p. 151-156, 2005.

PANANGALA, V.S.; FISH, N.A.; BARNUM, D.A. Microflora of the cervico-vaginal mucus of repeat breeder cows. The Canadian Veterinary Journal, v. 19, n. 4, p. 83-89, 1978.

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

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

PETIT, T.; SPERGERSER, J.; AURICH, J.; ROSENGARTEN, R. Prevalence of Chlamydiae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. Veterinary Microbiology, v. 127, n. 3, p. 325-333, 2008.

PFÜTZNER, H.; SACHSE, K. Mycoplasma bovis as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics), v. 15, n. 4, p. 1477-1494, 1996.

PICARD, L.; SAUVAGEAU, R.; LAMOTHE, P. Influence de la tylosine soluble sur l'endometre de la vache. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 25, n. 7, p. 300-301, 1984.

PILASZEK, J.; TRUSZCZYNSKI, M. Affinity of microorganisms of the genus *Ureaplasma* to the reproductive organs of cattle. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 11, n. 3, p. 177-180, 1988.

RAE, D.O.; CHENOWETH, P.J.; BROWN, M.B. Reproductive performance of beef heifers: effects of vulvo-vaginitis, *Ureaplasma diversum* and prebreeding antibiotic administration. *Theriogenology*, v. 40, n. 3, p. 497-508, 1993.

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

RAZIN, S.; TULLY, J.G. Biochemical and enzymatic test in *Mycoplasma* identification. In: \_\_\_\_\_ *Methods in Mycoplasmaology: Mycoplasma Characterization*. New York: Academic Press, 1983, v. 1, p. 335-389.

RAZIN, S. Peculiar properties of mycoplasmas: the smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 100, n. 1-3, p. 423-431, 1992.

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

RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. *Biologicals*, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010.

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

RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C.; DOIG, P.A.; MILLER, R.B. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*. *Theriogenology*, v. 21, n. 2, p. 295-301, 1984.

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

SANDERSON, M.W.; CHENOWETH, P.J.; YEARY, T.; NIETFELD, J.C. Prevalence and reproductive effects of *Ureaplasma diversum* in beef replacement heifers and the relationship to blood urea nitrogen level. *Theriogenology*, v. 54, n. 3, p. 401-408, 2000.

SANTOS, S.B.; JUNIOR, J.W.P.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, A.R.; OLIVEIRA, J.M.B.; VERAS, G.A.; NASCIMENTO, E.R.; MOTA, R.A. Ocorrência de Mollicutes e *Ureaplasma* spp. em surto de doença reprodutiva em rebanho bovino no Estado da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 3, p. 315-318, 2013.

SARTORI, R.; DODE, M.A.N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS. In: Simpósio internacional de reprodução animal aplicada. 3., 2008, Londrina. Anais... Londrina: SIRAA, 2008. p. 175-194.

SCOTT, P.R.; MACRAE, A.I.; PENNY, C.D. In: \_\_\_\_\_. *Cattle Medicine*. London: Manson Publishing Ltd, 2011. p. 7-38.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. *Semina. Ciências Agrárias*, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.

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

SMITH, A.; CHOUSALKAR, K.K.; CHENOWETH, P.C. Polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma diversum* from urogenital swabs in cattle in Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 90, n. 7, p. 275-276, 2012.

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

SPRECHER, D.J.; COE, P.H.; WALKER, R.D. Relationships among seminal culture, seminal white blood cells, and the percentage of primary sperm abnormalities in bulls evaluated prior to the breeding season. *Theriogenology*, v. 51, n. 6, p. 1197-1206, 1999.

STALHEIM, O.H.; PROCTOR, S.J.; GALLAGHER, J.E. Growth and effects of *Ureaplasma diversum* (T Mycoplasmas) in bovine oviductal organ cultures. *Infection and Immunity*, v. 13, n. 3, p. 915-925, 1976.

STIPKOVITS, L.; VARGA, Z.; LABER, G.; BÖCKMANN, J. A comparison of the effect of tiamulin hydrogen fumarate and tylosin tartrate on mycoplasmas of ruminants and some animal ureaplasmas. *Veterinary Microbiology*, v. 9, n. 2, p. 147-153, 1984.

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

TRAMUTA, C.; LACERENZA, D.; ZOPPI, S.; GORIA, M.; DONDO, A.; FERROGLIO, E.; NEBBIA, P.; ROSATI, S. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 23, n. 4, p. 657-664, 2011.

TRUSCOTT, R.B.; ONOVIRAM, O.; RUHNKE, H.L.; FISH, N.A.; BARKER, C.A. In vitro antimicrobial sensitivity of *Mycoplasmas* isolated from the bovine genital tract. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 39, n. 4, p. 416-420, 1975.

TRUSCOTT, R.B. *Ureaplasma* serotypes associated with the bovine urogenital tract. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v. 47, n. 4, p. 471, 1983.

TRYON, V.V.; BASEMAN, J.B. Pathogenic determinants and mechanisms. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R.N.; FINCH, L.R.; BASEMAN, J.B.; *Mycoplasmas:*

Molecular Biology and Pathogenesis. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992. p. 457-471.

USDA – United States Department of Agriculture. Livestock and Poultry: World Markets and Trade, Apr. 2014. Disponível em:  
<[http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock\\_poultry.pdf](http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf).> Acesso em: Apr. 2014.

VAN KUPPEVELD, F.J.; VAN DER LOGT, J.T.; ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J.; QUINT, W.G.; NIESTERS, H.G.; GALAMA, J.M.; MELCHERS, W.J. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Applied and Environmental Microbiology, v. 58, n. 8, p. 2606-2615, 1992.

WALKER, R.L. Mollicutes. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. Microbiologia Veterinaria. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2003. p. 155-162.

WOESE, C.R.; MANILOFF, J.; ZABLEN, L.B. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 77, n. 1, p. 494-498, 1980.



**2 OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um sistema molecular de diagnóstico etiológico para infecções genitais ocasionadas por bactérias das espécies *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* em fêmeas bovinas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma PCR genérica para a amplificação de sequências genômicas conservadas no DNA de *Mollicutes*;
- Desenvolver reações de *nested*-PCR para que por meio da amplificação parcial de sequências genômicas presentes em *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* e em *Ureaplasma diversum* seja possível a diferenciação desses três principais patógenos bacterianos envolvidos em infecções genitais em fêmeas bovinas;
- Avaliar o sistema de diagnóstico etiológico molecular de *Mollicutes* desenvolvido frente a amostras biológicas obtidas a partir de amostras clínicas de vulvovaginite em fêmeas bovinas.

**3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### 3.1 Diagnóstico Etiológico Molecular De Infecções Genitais Em Fêmeas Bovinas Ocasionadas Por *Mollicutes* Dos Gêneros *Mycoplasma* E *Ureaplasma*

##### RESUMO

A vulvovaginite granular (VVG) é uma infecção caracterizada pela presença de secreção, granulações e vesículas nas mucosas vaginal e vulvar descrita em fêmeas bovinas de várias partes do mundo. Bactérias dos gêneros *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum*, que se caracterizam por serem fastidiosos e de difícil diagnóstico, são frequentemente descritos como os principais agentes etiológicos envolvidos nessa infecção. O objetivo deste estudo foi desenvolver um sistema de diagnóstico molecular, constituído por uma PCR genérica seguida de uma *nested*-PCR, para a identificação de espécies bacterianas da classe *Mollicutes* em material biológico proveniente de animais com VVG. Para a PCR genérica foram desenhados *primers* consensuais degenerados (MolliFw1 / MolliRv1) tendo como alvo uma região conservada denominada espaço intergênico (ITS) e parte dos genes ribossomais 16S e 23S do genoma dos *Mollicutes*. Posteriormente, foram desenhados *primers* internos para reações individuais de *nested*-PCR específica para as espécies de *M. bovis* (MybovisFw2 / MybovisRv2), *M. bovigenitalium* (MygenitFw3 / MygenitRv3) e *U. diversum* (UdivFw4 / UdivRv4). Para determinar a especificidade dos *primers* os produtos amplificados por meio de *nested*-PCR foram submetidos ao sequenciamento e análise da sequência de nucleotídeos. O sistema de diagnóstico desenvolvido foi ainda avaliado frente a 31 amostras de *swabs* vaginais colhidos de vacas com vulvovaginite clínica, provenientes de três rebanhos sendo dois de corte dos estados de Minas Gerais ( $n=12$ ) e Mato Grosso do Sul ( $n=11$ ) e um leiteiro do estado do Paraná ( $n=8$ ). Todas as 31 amostras foram previamente avaliadas quanto a presença de herpesvírus bovino - 1 por meio de *semi nested*-PCR e foram negativas. Em 87,1% (27/31) das amostras avaliadas foram identificados pelo menos um dos micro-organismos investigados. Infecções singulares e mistas ocorreram em 54,8% (17/31) e 32,2% (10/31) das amostras, respectivamente. *U. diversum* foi identificado em 83,8% (26/31) e o *M. bovigenitalium* em 35,4% (11/31) das amostras analisadas. Nenhum dos três rebanhos bovinos incluídos no estudo apresentou infecção singular por *M. bovis*. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem a importância de *U. diversum* e do *M. bovigenitalium* na etiologia da VVG. As taxas de positividade para *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* obtidas foram semelhantes e/ou superiores aos resultados apresentados em estudos que incluíram como métodos de diagnóstico técnicas de cultivo bacteriológico e também reações moleculares como PCR e *nested*-PCR. O sistema molecular de diagnóstico de infecções genitais em fêmeas bovinas ocasionadas por bactérias da classe *Mollicutes* revelou-se como uma alternativa viável, rápida, sensível e específica para o diagnóstico de *M. bovis*, *M. bovigenitalium* e *U. diversum* a partir de material biológico. O diagnóstico precoce dos três principais patógenos bacterianos envolvidos em infecções genitais em vacas com VVG é de grande importância, pois possibilita a implantação de medidas de tratamento, controle e profilaxia mais rápidas e efetivas das infecções.

**Palavras-chave:** Vacas. Vulvovaginite granular. PCR genérica. *nested*-PCR.

### 3.2 Introdução

A vulvovaginite granular (VVG) é uma doença genital infecciosa que acomete os bovinos e foi descrita pela primeira vez por Isepponi na Suíça em 1887. Na fase aguda a infecção é caracterizada clinicamente por hiperemia da mucosa genital, súbito aparecimento de secreção vulvar mucopurulenta profusa, assim como pela presença de granulações e/ou vesículas nas mucosas vaginal e vulvar, 4 a 10 dias após o contato com o micro-organismo (DOIG et al., 1979).

Várias etiologias foram propostas para a VVG como bactérias, protozoários, vírus e deficiência nutricional (HUNTER et al., 1958; DOIG, 1981). Posteriormente, estudos demonstraram o envolvimento de bactérias do gênero *Mycoplasma* (*M. bovis* e *M. bovis genitalium*) e *Ureaplasma* (*U. diversum*) na patogenia da VVG em bovinos (HIRTH et al., 1966; RHUNKE et al., 1978; DOIG et al., 1980). Sendo, estes micro-organismos atualmente considerados os principais agentes etiológicos desta infecção genital em bovinos.

Os *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas* pertencem à classe dos *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae*. Organismos pertencentes a essa classe são os menores procariontes de vida livre e se caracterizam pela ausência de parede celular e pela morfologia das colônias em forma de “ovo frito” (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Os *Mycoplasma* e *Ureaplasmas* podem ser encontrados como comensais ou patógenos do trato urogenital de bovinos. Estes micro-organismos já foram isolados de bovinos, ocasionando infecções respiratórias, urogenitais, articulares, mamárias, conjuntivais e neurológicas (NICOLET, 1996; RAZIN et al., 1998).

A VVG pode interferir no reconhecimento materno da gestação, na implantação e desenvolvimento do embrião, resultando em morte embrionária precoce ou tardia, infertilidade e repetição de cio (KREPLIN et al., 1987; CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994; SMITS et al., 1994). Os animais infectados podem apresentar outras patologias do sistema reprodutivo decorrentes da inflamação como cervicite, salpingite, endometrite e abortamento (DOIG et al., 1980; PFÜTZNER; SACHSE, 1996; GIVENS; MARLEY, 2008; GHANEM et al., 2013).

Distúrbios reprodutivos associados à VVG com o envolvimento de *Mollicutes* são descritos em rebanhos bovinos de vários países como Canadá, Costa Rica, Áustria, Israel, Índia, Itália, Austrália e Japão (DOIG et al., 1979; LEÓN et al., 1995; PETIT et al., 2008; LYSNYANSKY et al., 2009; CHANDRA et al., 2010; TRAMUTA et al., 2011; SMITH et al., 2012; ARGUE et al., 2013; GHANEM et al., 2013).

No Brasil, a infecção já foi relatada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Alagoas, Goiás, Santa Catarina, Paraíba, Bahia e, recentemente no Mato Grosso (CARDOSO et al., 2000a; NASCIMENTO et al., 2005; OLIVEIRA FILHO et al., 2005; BUZINHANI et al., 2007; GAMBARINI et al., 2009; SANTOS et al., 2013; MARQUES et al., 2013; GAETI et al., 2014). Essa ampla distribuição por várias regiões geográficas demonstra a ocorrência da infecção em rebanhos bovinos brasileiros. Apesar dos diversos relatos da doença, o envolvimento dos *Mollicutes* nas patologias do sistema reprodutor de bovinos não está bem esclarecido. Possivelmente as dificuldades encontradas nas técnicas de diagnóstico utilizadas para a identificação destas bactérias, restringem a caracterização epidemiológica e patogênica da VVG (BUZINHANI et al., 2007).

Os métodos utilizados para a detecção de *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* a partir de amostras biológicas obtidas de animais com sinais clínicos estão restritos às técnicas de identificação sorológica e isolamento bacteriano. No entanto, estes procedimentos são demorados, laboriosos, dispendiosos e de difícil padronização (SIMECKA et al., 1992; VAN KUPPEVELD et al., 1992). O isolamento ou cultivo dos mollicutes pode ainda ser prejudicado, pois estes micro-organismos são fastidiosos e exigem meios de cultura enriquecidos. Para o isolamento de *Mollicutes* são necessários cuidados adicionais durante a coleta e transporte de materiais biológicos. Esses aspectos, que interferem tanto na especificidade quanto na sensibilidade do cultivo bacteriano como método de diagnóstico de eleição, têm influenciado na implementação de técnicas mais rápidas, sensíveis e específicas para a detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasmas* em amostras clínicas (CARDOSO et al., 2000b).

O objetivo do estudo foi desenvolver um sistema de diagnóstico molecular para a identificação de *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *U. diversum* em swabs vulvovaginais de fêmeas bovinas apresentando quadro clínico de vulvovaginite e distúrbios reprodutivos.

### 3.3 Material e Métodos

#### 3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*)

Com base em sequências depositadas no *GenBank* (tabela 1), inicialmente, foram desenhados *primers* consensuais degenerados tendo como alvo uma região conservada presente nos *Mollicutes* denominada espaço intergênico (ITS) e em parte dos genes ribossomais 16S e 23S (figura 2, 3). Em uma reação de PCR genérica os *primers* denominados MolliFw1 (*forward*) e MolliRv1 (*reverse*) amplificam fragmentos com tamanho variando de 847 a 866 pb do genoma dos *Mollicutes*. A tabela 1 apresenta as principais características dos *primers* MolliFw1 e MolliRv1.

Posteriormente, foram desenhados *primers* internos (figura 4) com o objetivo de amplificar especificamente segmentos genômicos de *M. bovis*, *M. bovigentialium* e *U. diversum*, tendo como base os produtos amplificados pelos *primers* degenerados MolliFw1 e MolliRv1. Em reações de *nested*-PCR espécie específica os *primers* denominados MybovisFw2 / MybovisRv2; MygenitFw3 / MygenitRv3; e UdivFw4 / UdivRv4; amplificam produtos de 488, 296 e 404 pb do genoma de *M. bovis*, *M. bovigentialium* e *U. diversum*, respectivamente (tabela 2).

Amostras de *M. bovis*, *M. bovigentialium* e *U. diversum* obtidas de casos clínicos de VVG foram utilizadas para a avaliação da especificidade dos *primers* desenhados nesse estudo, bem como para a padronização das condições para a realização das reações da PCR genérica e da *nested*-PCR espécie específica. Após a padronização das reações as sequências obtidas de cada espécie na *nested*-PCR específica foram depositadas com os seguintes números no *GenBank*: KJ767190 (*M. bovigentialium* strain BRA/UEL1); KJ767191 (*M. bovis* strain BRA/UEL2); KJ767192 (*U. diversum* strain BRA/UEL3). O DNA das cepas BRA/UEL1 (*M. bovigentialium*), BRA/UEL2 (*M. bovis*) e BRA/UEL3 (*U. diversum*) foi utilizado como controle positivo das reações de PCR genérica e *nested*-PCR específica para cada espécie.

**Tabela 1** – Características dos *primers* genéricos desenhados para a amplificação da região denominada espaço intergênico (ITS) e em parte dos genes ribossomais 16S e 23S presentes nos *Mollicutes*.

	Número de acesso	MolliFw1 5'>3'	MolliRv1 5'>3'	Tamanho do produto (pb)
		CCGTCAAACYATGGGAGC*	GTGYCCCGCCMTACTCAGG*	
<i>M. bovis</i>	AY780798	-----C-----	---C-----C-----	864
<i>M. bovigentalium</i>	AY780797	-----C-----	---C-----C-----	863
<i>M. agalactiae</i>	NC_01394 8	-----C-----	---C-----C-----	866
<i>U. diversum</i>	JN935894	-----T-----	---T-----A-----	847
<i>U. urealyticum</i>	NC_01137 4	-----T-----	---T-----C-----	852
<i>U. parvum</i>	NC_01050 3	-----T-----	---T-----C-----	851

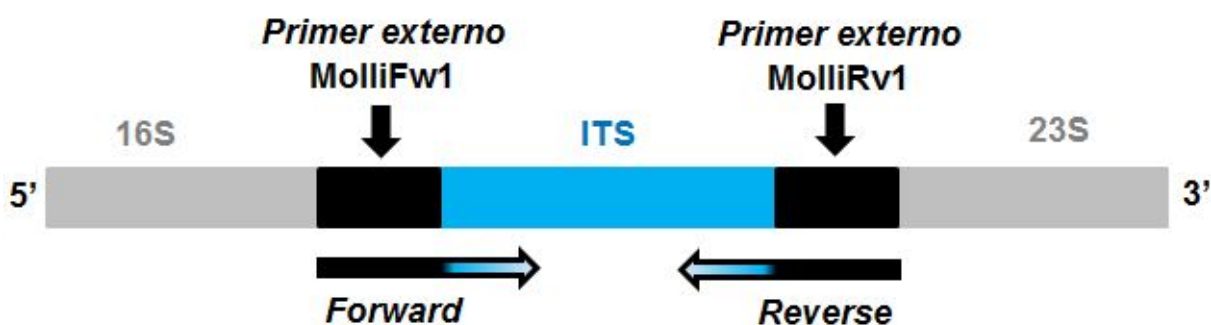
\*Nucleotídeos degenerados: Y=C,T; M=C, A.

**Figura 2** – Representação esquemática da região denominada espaço intergênico (azul) e dos genes ribossomais 16S e 23S (cinza) presente nos *Mollicutes*.



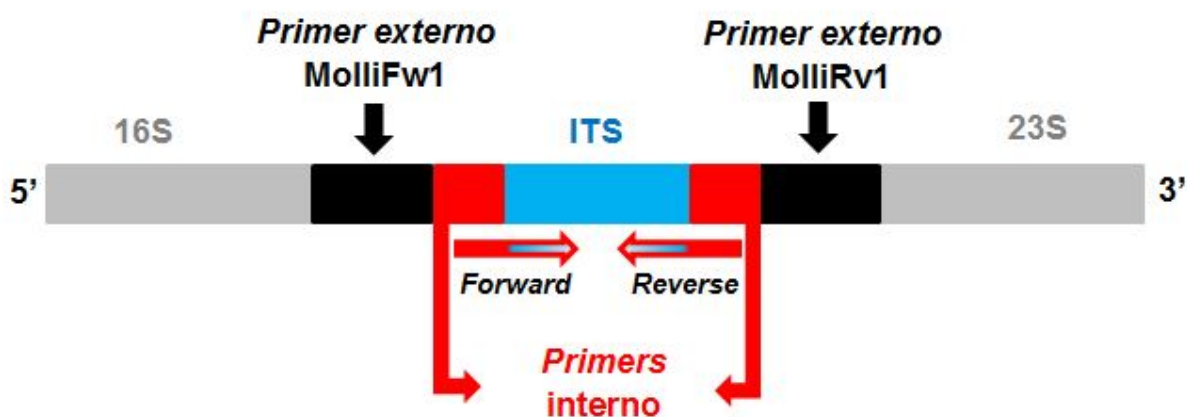
Fonte: O próprio autor

**Figura 3** – Localização dos *primers* externos MolliFw1 / MolliRv1 (preto) desenhados para a amplificação da região espaço intergênico (ITS) e em parte dos genes ribossomais 16S e 23S do genoma dos *Mollicutes* por meio da PCR genérica.



Fonte: O próprio autor

**Figura 4** – Localização dos pares de *primers* internos MybovisFw2 / MybovisRv2, MygenitFw3 / MygenitRv3 e UdivFw4 / UdivRv4 (vermelho) desenhados para a amplificação da região genômica denominada espaço intergênico (ITS) de *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *U. diversum* por meio de *nested* – PCR espécie específica.



Fonte: O próprio autor

**Tabela 2** – Características dos *primers* desenhados para a amplificação da região espaço intergênico do genoma de *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum*.

<i>Primers</i>	Direção	Sequência	Tamanho do produto (pb)
MybovisFw2	<i>Forward</i>	5' -GTACACTTGTCTTTTATCACTATA-3'	488
MybovisRv2	<i>Reverse</i>	5' -AAGGTATCTCGCTTTATGTCCT-3'	
MygenitFw3	<i>Forward</i>	5' -CGTATTGATTCATCGAGTAAT-3'	296
MygenitRv3	<i>Reverse</i>	5' -ATGGTGTCTCGCTCGACT-3'	
UdivFw4	<i>Forward</i>	5' -TGGTCGGATTCTATTTAGTT-3'	404
UdivRv4	<i>Reverse</i>	5' -TGGCTACTGAGATGTTTCAC-3'	

Fonte: O próprio autor

### 3.3.2 Amostras clínicas

Foram utilizadas 31 amostras de *swabs* vaginais obtidas de casos clínicos de vulvovaginite. As amostras eram provenientes de três rebanhos bovinos, sendo dois de vacas de corte da raça Nelore dos estados de Minas Gerais (MG;  $n=12$  animais) e Mato Grosso do Sul (MS;  $n=11$  animais) e um rebanho leiteiro da raça Holandesa Preta e Branca do estado do Paraná (PR;  $n=8$  animais). Os *swabs* vaginais foram colhidos no período de agosto/2013 a fevereiro/2014 e, transportados em microtubos contendo 500  $\mu\text{L}$  de PBS (tampão salino fosfato, pH 7,2), nesse período, permaneceram estocados em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . No momento da colheita todas

as vacas apresentavam sinais clínicos característicos de vulvovaginite em associação com relatos de infertilidade e mortalidade embrionária precoce e tardia. As biotecnologias da reprodução utilizadas nos rebanhos avaliados eram transferência de embriões (TE) em MG, inseminação artificial em tempo fixo (IATF) no MS e inseminação artificial (IA) no rebanho leiteiro do estado do PR. Os três rebanhos eram livres de Brucelose e empregavam vacinação regular contra Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR), Diarreia Viral Bovina (BVD) e Leptospirose. Todas as amostras de *swabs* vaginais incluídas nesse estudo foram triadas como negativas para herpesvírus bovino-1 (BoHV-1) por meio de *semi nested*-PCR, realizada segundo Takiuchi et al. (2003).

### 3.3.3 Extração de DNA

Os microtubos foram descongelados em temperatura ambiente. Após homogeneização em *vórtex* e centrifugação a 1500 x *g* por 15 min a 4°C, alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram tratadas com tampão de lise (SDS 10%, dodecil sulfato de sódio, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S e 20 mg/mL de proteinase K). Após incubação por 30 min a 56° C o DNA presente nas amostras biológicas foi extraído pelo método da sílica / isotiocianato de guanidina descrito por Boom et al. (1990). Alíquotas de água ultrapura autoclavada foram incluídas como controle negativo.

### 3.3.4 PCR genérica

Para a amplificação parcial do DNA de *Mollicutes* por meio da PCR genérica foram utilizados 5 µL de DNA extraído e 45 µL de *mix* PCR contendo 1 µL (20 pmol) dos *primers forward* (MolliFw1) e *reverse* (MolliRv1); 200 mM de cada dNTP (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA); 2,5 unidades da enzima *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Life Technologies, BRA); 1x PCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e água ultrapura autoclavada suficiente para o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termo ciclador (Swift MaxPro, Esco Healthcare, EUA) com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa inicial de 5 min à 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 min/94°C, 1 min/55°C, 1 min/72°C, e uma extensão final de 7 min/72°C. Alíquotas de 5 µL do produto da PCR foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL) em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89

mM ácido bórico; 2 mM EDTA) sob voltagem constante (90 V) por aproximadamente 45 min e visualizado sob luz UV.

### 3.3.5 *Nested-PCR*

Para a amplificação específica do DNA de *M. bovis*, *M. bovisgenitalium* e de *U. diversum* a partir da PCR genérica realizada com *primers* degenerados para amplificação parcial de DNA de *Mollicutes* foram realizadas três reações individuais de *nested-PCR* utilizando os *primers* MybovisFw2 / MybovisRv2 (*M. bovis*); MygenitFw3 / MygenitRv3 (*M. bovisgenitalium*) e UdivFw4 / UdivRv4 (*U. diversum*). Para cada reação de *nested-PCR* foram utilizados 1 µL do produto da PCR genérica e 49 µL de *mix nested-PCR*, contendo 1 µL (20 pmol) de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 200 mM de cada dNTP (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, EUA); 1,5 unidades da enzima *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen, Life Technologies, BRA); 1x PCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl); 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub> e água ultrapura autoclavada suficiente para o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termo ciclador de acordo com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de desnaturação inicial de 5 min à 94°C, seguida de 35 ciclos de 1 min/94°C, 1 min/58°C, 1 min/72°C, e uma extensão final por 7 min/72°C. Alíquotas de 5 µL do produto da *nested-PCR* foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente. O mesmo protocolo foi realizado para as três reações de *nested-PCR* utilizando os pares de *primers* específicos para *M. bovis*, *M. bovisgenitalium* e *U. diversum*.

### 3.3.6 *Purificação, sequenciamento e análise das sequências*

Com o objetivo de caracterizar a especificidade dos produtos amplificados nas reações de *nested-PCR* um produto amplificado representante de cada um dos micro-organismos avaliados, obtido a partir de amostras biológicas provenientes dos três rebanhos bovinos, foi selecionado para se realizar o sequenciamento de nucleotídeo. Os produtos foram purificados utilizando o kit comercial *PCR DNA and Gel Band Purification* (Invitrogen, Life Technologies, EUA) e quantificados em *Qubit<sup>TM</sup> Fluorometer* (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) utilizando o kit *Quant-iT<sup>TM</sup> dsDNA BR Assay* (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O sequenciamento foi realizado utilizando o kit *BigDye Terminator v 3.1 Cycle*

*Sequencing* (Applied Biosystems, Foster city, EUA) com os *primers* correspondentes *sense* e *antisense*, em sequenciador automático *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster city, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As qualidades das sequências obtidas foram analisadas utilizando o *software* PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/php>). As sequências eram selecionadas somente se as bases possuísem qualidade igual ou maior que 20. As sequências consensuais foram determinadas utilizando o *software* CAP3 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/php/cap3.pl>) e a busca por similaridade foi realizada comparando com as sequências depositadas no *GenBank* utilizando o *software* BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

O alinhamento das sequências obtidas foi realizado utilizando o *software* CLUSTAL W (versão 1.4) incluso no pacote MEGA versão 5.1 e a matriz de identidade foi obtida utilizando o *software* BioEdit versão 7.0.8.0. O número de acesso dos *Mollicutes* no *GenBank* utilizados para a análise filogenética: AY780798 (*Mycoplasma (M. bovis)*); AY780797 (*M. bovigenitalium*); NC\_013948 (*M. agalactiae*); JN935894 (*Ureaplasma (U. diversum)*); NC\_011374 (*U. urealyticum*); NC\_010503 (*U. parvum*).

### 3.4 Resultados

#### 3.4.1 PCR genérica e nested-PCR

O par de *primers* degenerados (MolliFw1 / MolliRw1) desenhados nesse estudo para a PCR genérica possibilitaram a amplificação de um produto com aproximadamente 860 pb do genoma dos *Mollicutes*. A amplificação de fragmentos com tamanho de 488, 296 e 404 pb foi obtida utilizando-se um par de *primers* interno para cada espécie na *nested-PCR* específica para *M. bovis* (MybovisFw2 / MybovisRw2), *M. bovigenitalium* (MygeniFw3 / MygeniRw3) e *U. diversum* (UdivFw4 / UdivRw4), respectivamente (figura 5).

Nos três rebanhos, pelo menos um dos potenciais patógenos do trato reprodutivo da fêmea bovina foi diagnosticado. Nos rebanhos do estado de Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, ocorreram infecções mistas com o envolvimento de mais de um micro-organismo. No rebanho paranaense, foi diagnosticado apenas o *U. diversum*. Foram identificadas 80,6% (25/31) de amostras positivas para

*Mollicutes*, entretanto duas amostras negativas na PCR genérica, foram positivas nas reações de *nested-PCR* específica para espécie de *M. bovis* e *U. diversum*. Das 31 amostras, em 87,1% (27/31) foram identificados pelo menos um dos micro-organismos avaliados. As infecções singulares foram mais frequentes 54,8% (17/31) que as mistas, que ocorreram em 32,2% (10/31) das amostras, das quais duas amostras foram positivas para os três agentes e oito amostras para *U. diversum* e *M. bovis*. O *U. diversum* foi identificado em 83,8% (26/31) das amostras. O segundo micro-organismo mais frequente foi o *M. bovis* identificado em 35,4% (11/31) das amostras. Infecção singular por *M. bovis* não foi diagnosticada em nenhum dos três rebanhos incluídos no estudo. A tabela 1 apresenta os resultados do diagnóstico de *M. bovis*, *M. bovis* e *U. diversum* distribuídos de acordo com os rebanhos avaliados e o tipo de infecção (singular ou mista).

**Tabela 3** – Resultados do diagnóstico de *M. bovis*, *M. bovis* e *U. diversum* em swabs de vacas com vulvovaginite distribuídos de acordo com os rebanhos avaliados e o tipo de infecção (singular ou mista) diagnosticada.

Infecções	Micro-organismos*	Rebanho (%)			Total (%) (n=31)
		PR (n=8)	MS (n=11)	MG (n=12)	
Singular	Mb	–	–	–	–
	Mbg	–	1 (9,1)	–	1 (3,2)
	Udiv	8 (100)	1 (9,1)	7 (58,3)	16 (51,6)
Mista	Mb + Mbg	–	–	–	–
	Mb + Udiv	–	–	–	–
	Mbg + Udiv	–	5 (45,4)	3 (25)	8 (25,8)
	Mb + Mbg + Udiv	–	–	2 (16,7)	2 (6,4)
Amostras negativas		–	4 (36,4)	–	4 (12,9)

\* Mb (*Mycoplasma bovis*); Mbg (*Mycoplasma bovis*); Udiv (*Ureaplasma diversum*)

### 3.4.2 Sequenciamento

Os amplicons obtidos da *nested-PCR* foram sequenciados e comparados com as sequências disponíveis na base pública de dados (*GenBank*). A análise das sequências possibilitou a identificação das espécies *M. bovis*, *M. bovis* e *U. diversum*, que apresentaram, respectivamente, 100%, 99% e 100% de identidade de

nucleotídeos com as sequências de número de acesso AY780798, AY816346 e JN935894, depositadas anteriormente no *GenBank*.

### 3.5 Discussão

O método de diagnóstico desenvolvido neste estudo, utilizando uma amplificação consensual por meio de PCR genérica com posterior utilização do produto amplificado para a realização de reações individuais de *nested-PCR* específica para cada espécie bacteriana (*M. bovis*, *M. bovigentalium* e *U. diversum*) mostrou-se como alternativa viável para o diagnóstico das três principais bactérias da classe *Mollicutes* envolvidas na etiologia da VVG em bovinos. Com a realização de duas etapas de amplificação, utilizando-se na primeira etapa (PCR genérica) *primers* externos e, na segunda etapa de amplificação (*nested-PCR* específica para cada espécie) três diferentes pares de *primers* internos, foi possível a obtenção de produtos com tamanhos específicos para *M. bovis* (488 pb), *M. bovigentalium* (296 pb) e *U. diversum* (404 pb). Adicionalmente, os tamanhos de produtos amplificados nas reações de *nested-PCR* possibilitaram facilmente a diferenciação das espécies (*M. bovis*, *M. bovigentalium* e *U. diversum*), quando visualizados em gel de agarose. A PCR genérica com os *primers* externos para amplificação do genoma dos *Mollicutes* não detectou duas amostras, que foram positivas na *nested-PCR* com os *primers* internos específicos para *M. bovigentalium* e *U. diversum*, o que evidencia o aumento da sensibilidade das reações quando se utiliza técnica de *nested-PCR*. A análise das sequências de nucleotídeos confirmou que os micro-organismos identificados neste estudo se agruparam com as espécies de *M. bovis*, *M. bovigentalium* e *U. diversum* o resultado da matriz de identidade possibilitou demonstrar a especificidade dos produtos amplificados pelas reações de *nested-PCR* específica para cada espécie.

A identificação dos patógenos pesquisados nos três rebanhos bovinos sugere que a infecção pode ocorrer independente da raça, aptidão, biotecnologia de reprodução e região geográfica de origem. Essas informações contribuem consideravelmente com a ampliação dos conhecimentos relativos à epidemiologia da VVG causada por bactérias da classe *Mollicutes* em rebanhos bovinos brasileiros. Estudos comprovaram que *M. bovis*, *M. bovigentalium* e *U. diversum* podem ser transmitidos por técnicas de reprodução como IA, IATF, TE e FIV (BRITTON et

al., 1988; BIELANSKI et al., 2000; BUZINHANI et al., 2011). Esses aspectos justificam o diagnóstico de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* nos três rebanhos, que utilizavam diferentes biotecnologias de reprodução. Além disso, a transmissão venérea é um fator importante na disseminação da doença no rebanho, entretanto a transmissão iatrogênica não pode ser descartada (DOIG, 1981; GAETI et al., 2014).

A presença de secreção vaginal purulenta, e a ocorrência, intensidade e gravidade das lesões presentes na mucosa vulvovaginal de animais que apresentam VVG, pode ser classificada em escala de grau 0 a 4, associando o grau de lesão observado com a presença ou ausência de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (RAE et al., 1993; SANDERSON et al., 2000; GAMBARINI et al., 2009). Apesar de não ter sido utilizado em nosso estudo esse método de *score* de lesão, foram observadas infecções mistas em 32,2% (10/31) das amostras. Esse tipo de infecção pode predispor a ações patogênicas sinérgicas entre os micro-organismos identificados, o que pode aumentar a gravidade das lesões, além de outros sinais clínicos associados à VVG.

O *U. diversum* foi identificado em 83,8% das amostras, o segundo micro-organismo mais frequente foi o *M. bovis genitalium* identificado em 35,4%, sendo que todas as amostras foram negativas na *semi nested*-PCR para BoHV-1 evidenciando a importância principalmente de *U. diversum* e *M. bovis genitalium* na etiologia da VVG. Além de demonstrar a grande frequência de *U. diversum* em casos clínicos de VVG e a sua ampla distribuição uma vez que foi o único micro-organismo diagnosticado nos três rebanhos avaliados. Os resultados obtidos em nosso estudo foram semelhantes aos demonstrados por autores no Brasil (OLIVEIRA FILHO et al., 2005; BUZINHANI et al., 2007; GAMBARINI et al., 2009; SANTOS et al., 2013), cuja frequência das espécies do gênero *Mycoplasma* spp. foi baixa, havendo maior prevalência de amostras positivas para *U. diversum* isoladas de vacas com distúrbios reprodutivos e VVG. Esses resultados demonstraram que ambos os micro-organismos podem estar envolvidos nas vulvovaginites e em suas consequências como mortalidade embrionária, observadas nos três rebanhos bovinos.

No presente estudo, bactérias do gênero *Mycoplasma* foram identificadas tanto em infecções singulares quanto mistas sendo possível a determinação da espécie (*M. bovis* e/ou *M. bovis genitalium*) em todas as amostras positivas. Nascimento et al. (2005), avaliaram amostras de muco vulvovaginal de 14 vacas que apresentavam sinais clínicos de patologias reprodutivas e isolaram *Mycoplasma* spp.

em 8 (57,1%) das amostras, sendo que a caracterização da espécie somente foi possível em uma das amostras, sugerindo a presença de espécies não patogênicas presentes na microbiota do trato reprodutivo bovino entre os isolados. Mulira et al. (1992) isolaram 62,5% (65/104) *U. diversum* e 17,5% (18/104) de *Mycoplasma* spp. a partir de *swabs* vulvovaginais. Chandra et al. (2010) isolaram *U. diversum* e *Mycoplasma* spp em 10,3% (14/136) e 8% (11/136) respectivamente. Resultados positivos para *U. diversum* com taxas variando de 38,7 a 41,67% foram obtidos na Costa Rica, França e no Brasil por meio de cultivo bacteriológico (LEÓN et al., 1994; Le GRAND et al., 1995; CARDOSO et al., 2000a; OLIVEIRA FILHO et al., 2005). Desta forma, as taxas de positividade para *U. diversum* e *Mycoplasma* obtidas em nosso estudo foram superiores aos resultados apresentados nestes estudos que incluíram como método de diagnóstico apenas o isolamento e cultivo bacteriológico. Esta alta detecção pela técnica molecular evidencia a importância do desenvolvimento e implantação desta técnica para o diagnóstico etiológico de micro-organismos fastidiosos como *Mollicutes*, além de reduzir o tempo necessário para o diagnóstico final, contribuindo com a antecipação na adoção de medidas de tratamento, controle e profilaxia das infecções genitais ocasionadas por esses micro-organismos.

A identificação de *Mollicutes* por meio de PCR genérica em nosso estudo alcançou taxas superiores (80,6%) às obtidas por Buzinhani et al. (2007) e Santos et al. (2013) que, utilizando *primers* genéricos GPO3 e MGSO, descritos por Van Kuppeveld et al. (1992), identificaram *Mollicutes* em 63,4 e 65,6% das amostras, respectivamente. A PCR desenvolvida por Chávez González et al. (1995) para a identificação de *M. bovis* a partir de *swabs* nasais de bezerros com pneumonia foi utilizada por Buzinhani et al. (2007), que identificaram o micro-organismo em 9,8% das amostras de *swabs* vaginais avaliadas. Uma reação de PCR simplificada foi desenvolvida por Higuchi et al. (2010) para a triagem rápida de mastite causada por micoplasmas em bovinos leiteiros. O sistema possibilita a identificação de 7 espécies de micoplasmas incluindo *M. bovis* e *M. bovis genitalium*. Ghanem et al. (2013) utilizando a PCR simplificada em *swabs* vaginais de vacas identificaram *M. bovis genitalium* em 7,4% das amostras. Entretanto, Lysnyansky et al. (2009) obtiveram taxas superiores (55%) para *M. bovis genitalium* em *swabs* vulvovaginais, empregando reação de PCR descrita por Volokhov et al. (2006). Cardoso et al. (2000b) desenvolveram ensaio de *nested-PCR* para identificação de *U. diversum* a

partir de *swab* vulvovaginal de vacas e identificaram o agente em 52,9% (89/168) das amostras analisadas. Posteriormente, a técnica desenvolvida por Cardoso et al. (2000b) foi utilizada em outros estudos que relataram frequências de 7,4 a 38% de amostras positivas para *U. diversum* (BUZINHANI et al., 2007; SMITH et al., 2012; ARGUE et al., 2013; GHANEM et al., 2013; SANTOS et al., 2013; GAETI et al., 2014). Os ensaios de *nested*-PCR específica empregadas em nosso estudo possibilitou a identificação de *M. bovis* (6,4%), *M. bovis genitalium* (35,4%) e de *U. diversum* (83,8%) em valores semelhantes ou superiores aos apresentados nestes estudos que utilizaram técnicas moleculares (PCR e *nested*-PCR) para identificação de bactérias da classe *Mollicutes* a partir de *swabs* vaginais de vacas com VVG e distúrbios reprodutivos.

Até o momento não há descrição de PCR genérica com *primers* consensuais para amplificação de fragmentos do genoma dos *Mollicutes*, seguida de *nested*-PCR utilizando pares de *primers* internos específicos para as espécies de *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *U. diversum*, principalmente a partir de amostras biológicas como *swabs* vaginais. A técnica de PCR genérica e *nested*-PCR espécie específica possibilitou o rápido diagnóstico dos três principais patógenos bacterianos envolvidos em infecções genitais singulares e mistas em vacas com vulvovaginite. Os resultados obtidos das amostras de *swabs* colhidos em vacas com VVG demonstraram a presença dos patógenos em rebanhos bovinos de corte e leite e sistemas distintos de reprodução (TE/IATF/IA). A frequência de amostras positivas sugere que essas infecções possam estar amplamente distribuídas nos rebanhos brasileiros, considerando que foram identificadas amostras positivas em rebanhos das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil. Estudos têm indicado que a PCR e *nested*-PCR são mais sensíveis para a detecção de *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* quando comparada a técnica de cultivo e isolamento (CARDOSO et al., 2000b; BUZINHANI et al., 2007). A dificuldade para identificação desses micro-organismos por meio de técnicas de isolamento e cultivo bacteriológico, têm estimulado a implementação de técnicas mais rápidas, sensíveis e específicas para o diagnóstico de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* a partir de amostras clínicas. O método de diagnóstico desenvolvido poderá ser utilizado em amostras biológicas como *swabs* vaginais, o que possibilitará ampliar os dados sobre o envolvimento dessas bactérias em bovinos com distúrbios reprodutivos e VVG, além de evidenciar a ocorrência de infecções mistas.

### 3.6 Referências

ARGUE, B.; CHOUSALKARB, A.K.K.; CHENOWETHA, P.J. Presence of *Ureaplasma diversum* in the Australian cattle population. **Australian Veterinary Journal**, v. 91, n. 3, p. 99-101, 2013.

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

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.495-503, 1990.

BRITTON, A.P.; MILLER, R.B.; RUHNKE, H.L.; JOHNSON, W.H. The recovery of ureaplasmas from bovine embryos following in vitro exposure and ten washes. **Theriogenology**, v. 30, n. 5, p. 997-1003, 1988.

BUZINHANI, M.; METIFFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1368-1375, 2007.

BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R.C.; CORTEZ, B.A.; MARQUES, L.M.; MACHADO-SANTELLI, G.M.; ASSUMPCÃO, M.E.O.; TIMENETSKY, J. Invasion of *Ureaplasma diversum* in bovine spermatozoids. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 455, 2011.

CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L.M.P.S.; TEIXEIRA, S.R.; GENOVEZ, M.E. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers, first report. **Animal Reproduction Science**, v. 63, n. 3, p. 137-143. 2000a.

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

CHANDRA, P.; SINGH, Y.; GARG, D. Nand. Occurrence of *Ureaplasma diversum* in cows with various reproductive disorders. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e158, 2010.

CHÁVEZ GONZÁLEZ, Y.R.; BASCUÑANA, C.R.; BÖLSKE, G.; MATTSSON, J.G.; MOLINA, C.F.; JOHANSSON, K.E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes

from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 183-190, 1995.

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

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, 1979.

DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C. Experimental bovine genital ureaplasmosis II. Granular vulvitis, endometritis and salpingitis following uterine inoculation. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 44, n. 3, p. 259, 1980.

DOIG, P.A. Bovine genital mycoplasmosis. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 22, n. 11, p. 339, 1981.

GAETI, J.G.L.; LANA, M.V.; SILVA, G.S.; LERNER, L.; DE CAMPOS, C.G.; HARUNI, F.; COLODEL, E.M.; COSTA, E.F.; CORBELLINI, L.G.; NAKAZATO, L.; PESCADOR, C.A. *Ureaplasma diversum* as a cause of pustular vulvovaginitis in bovine females in Vale Guapore, Mato Grosso State, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, p. 1-5, 2014.

GAMBARINI, M.L.; KUNZ, T.L.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; PORTO, R.N.G.; OLIVEIRA, C.M.G.; BRITO, W.M.E.D.; VIU, M.A.O. Granular Vulvovaginitis Syndrome in Nelore pubertal and post pubertal replacement heifers under tropical conditions: role of *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma diversum* and BHV- 1. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 7, p. 1421-1426, 2009.

GHANEM, M. E.; HIGUCHI, H.; TEZUKA, E.; DEVKOTA, B.; IZAIKE, Y.; OSAWA, T. *Mycoplasma* infection in the uterus of early postpartum dairy cows and its relation to dystocia and endometritis. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 180-185, 2013.

GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, v. 70, p. 270-285, 2008.

HIGUCHI, H.; IWANO, H.; KAWAI, K.; OHTA, T.; OBAYASHI, T.; HIROSE, K.; ITO, N.; YOKOTA, H.; TAMURA, Y.; NAGAHATA, H. A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. **Journal of Veterinary Science**, v. 12, n. 2, p. 191-193, 2010.

HIRTH, R.S.; NIELSEN, S.W.; PLASTRIDGE, W.N. Bovine salpingo-oophoritis produced with semen containing a *Mycoplasma*. **Pathologia Veterinaria**, v. 3, n. 6, p. 616-632, 1966.

HUNTER, A.G.; HENDERSON, J.R.B.W.; DARDIRI, A.H. Granular vulvovaginitis: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 41, n. 8, p. 1024-1032, 1958.

KREPLIN, C.M.A.; RUHNKE, H.L.; MILLER, R.B.; DOIG, P.A. The effect of intrauterine inoculation with *Ureaplasma diversum* on bovine fertility. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 4, p. 440-443, 1987.

LE GRAND, D.; POUMARAT, F.; MARTEL, J.L. Infection génitale à *Ureaplasma diversum*: enquête chez les bovins en France. **Veterinary Research**, v. 26, n. 1, p. 11-20, 1995.

LEÓN, B.A.; CAMPOS, E.; BOLAÑOS, H.; CABALLERO, M. Risk factors for *Ureaplasma diversum* infections in cattle of a tropical environment. **Revista de Biología Tropical**, v. 43, n. 1-3, p. 21-25, 1994.

LYSNYANSKY, I.; BRENNER, J.; ALPERT, N.; BENJAMIN, A.; BERNSTEIN, M.; ELAD, D.; BLUM, S.; FRIEDGUT, O.; ROTENBERG, O. Identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. **Veterinary Record**, v. 165, n. 11, p. 319-322, 2009.

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

MULIRA, G.L.; SAUNDERS, J.R.; BARTH, A.D. Isolation of *Ureaplasma diversum* and mycoplasmas from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 33, n. 1, p. 46-49, 1992.

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

NICOLET, J. Animal mycoplasmoses: a general introduction. **Revue Scientifique et Technique**, v. 15, n. 4, p. 1233-1240, 1996.

OLIVEIRA FILHO, B.D.; PORTO, R.N.G.; GAMBARINI, M.L.; KUNZ, T.L.; FERRAZ, H.T.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T.; SOUSA, A.P.F. Isolamento do *Ureaplasma diversum* em muco vulvovaginal de vacas leiteiras repetidoras de estro no Estado de Alagoas, Brasil. **Archives of Veterinary**, v. 10, n. 2, p. 151-156, 2005.

PETIT, T.; SPERGSE, J.; AURICH, J.; ROSENGARTEN R. Prevalence of *Chlamydiae* and *Mollicutes* on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 3, p. 325-333, 2008.

PFÜTZNER, H.; SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 15, n. 4, p. 1477-1494, 1996.

RAE, D.O.; CHENOWETH, P.J.; BROWN, M.B. Reproductive performance of beef heifers: effects of vulvo-vaginitis, *Ureaplasma diversum* and prebreeding antibiotic administration. **Theriogenology**, v. 40, n. 3, p. 497-508, 1993.

- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasmas*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.
- RAZIN, S.; HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 183-190, 2010.
- RUHNKE, H.L.; DOIG, P.A.; MACKAY, A.L.; GAGNON, A.; KIERSTEAD, M. Isolation of ureaplasma from bovine granular vulvitis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, n. 2, p. 151-155, 1978.
- SANDERSON, M.W.; CHENOWETH, P.J.; YEARY, T.; NIETFELD, J.C. Prevalence and reproductive effects of *Ureaplasma diversum* in beef replacement heifers and the relationship to blood urea nitrogen level. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 401-408, 2000.
- SANTOS, S.B.; JUNIOR, J.W.P.; OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, A.R.; OLIVEIRA, J.M.B.; VERAS, G.A.; NASCIMENTO, E.R.; MOTA, R.A. Ocorrência de Mollicutes e *Ureaplasma* spp. em surto de doença reprodutiva em rebanho bovino no Estado da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 3, p. 315-318, 2013.
- SIMECKA, J.W.; DAVIS, J.K.; DAVIDSON, M.K.; ROSS, S.E.; STADTLANDER, C.T.; CASSELL, G.M. Mycoplasma diseases of animals. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R.; FINCH, L.; BASEMAN, J. **Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 391-415.
- SMITH, A.; CHOUSALKAR, K.K.; CHENOWETH, P.C. Polymerase chain reaction for detection of *Ureaplasma diversum* from urogenital swabs in cattle in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 90, n. 7, p. 275-276, 2012.
- SMITS, B.; ROSENDAL, S.; RUHNKE, H.L.; PLANTE, C.; O'BRIEN, P.J.; MILLER, R.B. Effects of *Ureaplasma diversum* on bovine oviductal explants: Quantitative measurement using a calmodulin assay. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.58, n. 2, p. 114-121, 1994.
- TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (Semi Nested-PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 43-56, 2003.
- TRAMUTA, C.; LACERENZA, D.; ZOPPI, S.; GORIA, M.; DONDO, A.; FERROGLIO, E.; NEBBIA, P.; ROSATI, S. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p. 657-664, 2011.
- VAN KUPPEVELD, F.J.; VAN DER LOGT, J.T.; ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J.; QUINT, W.G.; NIESTERS, H.G.; GALAMA, J.M.; MELCHERS, W.J. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2606-2615, 1992.

VOLOKHOV, D.V.; GEORGE, J.; LIU, S.X.; IKONOMI, P.; ANDERSON, C.; CHIZHIKOV, V. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 5, p. 680-698, 2006.

**CONCLUSÕES**

## 4 CONCLUSÕES

- A metodologia molecular desenvolvida nesse estudo, constituída por uma PCR genérica seguida de uma *nested*-PCR espécie-específica, possibilitou o diagnóstico etiológico de *M. bovis*, *M. bovigenitalium* e *U. diversum* de forma rápida e específica a partir de amostras clínicas obtidas de fêmeas bovinas com VVG;
- A utilização de uma PCR genérica para amplificação primária de um fragmento presente em genes conservados em *Mollicutes* e de um sistema de *nested*-PCR, com a amplificação de produtos internos, possibilitou a obtenção de taxas de resultados positivos para *M. bovis*, *M. bovigenitalium* e *U. diversum* em *swabs* vaginais de vacas com vulvovaginite semelhantes ou superiores às descritas na literatura;
- O s resultados das análises por *nested*-PCR dos *swabs* obtidos de vacas com vulvovaginite que foram incluídos nesse estudo demonstram que as infecções por *M. bovigenitalium* e por *U. diversum* estão presentes em rebanhos bovinos de corte e leite das três regiões geográficas avaliadas (sul, sudeste, centro-oeste), independentemente da biotecnologia de reprodução adotado (IA/IATF/TE).

## **APÊNDICES**

APÊNDICE A  
Protocolos e técnicas

- PCR para amplificação da região do espaço intergênico (ITS) e parte dos genes ribossomais 16S e 23S dos *Mollicutes*.

- *Mix* de PCR

Reagentes	Volumes ( $\mu\text{L}$ )
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Primer Forward</i> (20 pmol)	1
<i>Primer Reverse</i> (20 pmol)	1
<i>Platinun</i> ®Taq DNA <i>Polymerase</i> (2,5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5
Aguá DEPC	32
DNA extraído	5
Volume final	50

- Para a amplificação dos *M. bovis*, *M. bovigentialium* e *U. diversum* foi utilizado o mesmo protocolo de *mix* na *nested-PCR*, diferindo apenas nos *primers* específico para cada espécie.

- *Mix de nested-PCR*

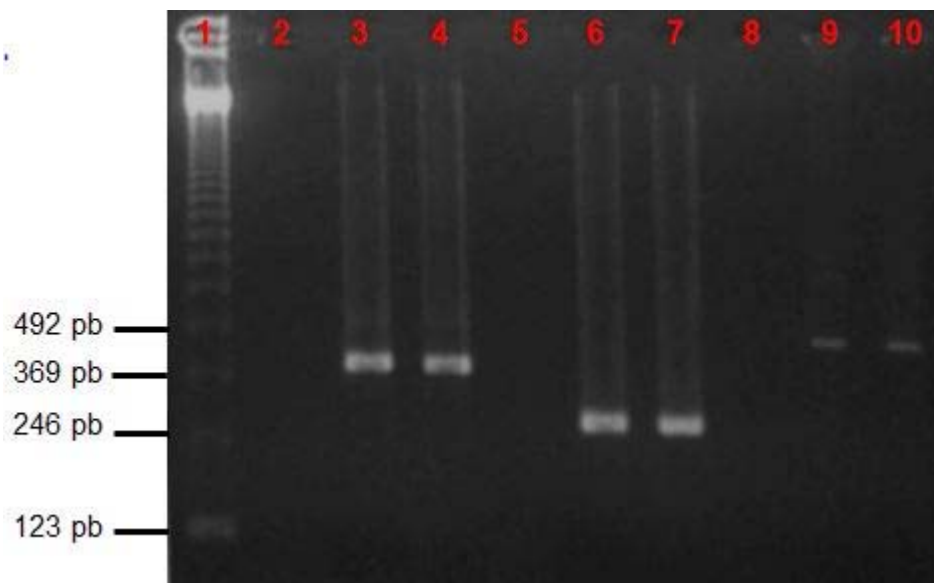
<b>Reagentes</b>	<b>Volumes (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl <sub>2</sub>	1,25
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Primer Forward</i> (20 pmol)	1
<i>Primer Reverse</i> (20 pmol)	1
<i>Platinun®Taq DNA Polymerase</i> (2,5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,3
Aguá DEPC	36,45
Produto da PCR	1
Volume final	50

- **Esquema do programa de PCR da região genômica compreendendo o espaço intergênico (ITS) e parte dos genes ribossomais 23S e 16S dos *Mollicutes* e *nested-PCR* utilizado para *M. bovis*, *M. bovigentialium* e *U. diversum*.**

<b>PCR genérica - <i>Mollicutes</i></b>	<b><i>nested-PCR</i> específica para <i>M. bovis</i>, <i>M. bovigentialium</i> e <i>U. diversum</i></b>
Desnaturação inicial (94°C / 5 min)	Desnaturação inicial (94°C / 5 min)
35 ciclos (94°C / 1 min; 55 °C / 1 min; 72°C / 1min)	35 ciclos (94°C / 1 min; 58 °C / 1 min; 72°C/1min)
Extensão final (72°C / 7 min)	Extensão final (72°C / 7 min)

APÊNDICE B  
Figura 5

**Figura 5** — Fotodocumentação, eletroforese em gel de agarose 2%, dos produtos da *nested-PCR* específica utilizando um par de *primers* interno para cada espécie bacteriana pesquisada. Coluna 1: padrão 123 pb. Colunas 3 e 4: *U. diversum* (isolado clínico / *swab* vaginal). Colunas 6 e 7: *M. bovigentialium* (isolado clínico / *swab* vaginal). Colunas 9 e 10: *M. bovis* (isolado clínico / *swab* vaginal). Colunas 2, 5 e 8 controle negativo.



**Fonte:** O próprio autor

## **ANEXOS**

## ANEXO A

## Lista de reagentes

1. Acetona, P.A. ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) P.M. 58,08 (Dinâmica<sup>®</sup>)
2. Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) P.M. 61,83 (Sicalab<sup>®</sup>)
3. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen<sup>®</sup>)
4. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico - EDTA, P.A. ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) P.M. 372,24 (Reagen<sup>®</sup>)
5. Agarose (Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies)
6. Água DEPC (Dietil pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
7. Álcool etílico absoluto ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) P.M. 46,07 (Nuclear<sup>®</sup>)
8. Azul de bromofenol (Sigma<sup>®</sup>)
9. Bicarbonato de sódio P.A. ( $\text{NaHCO}_3$ ) P.M. 84,01 (Biotec<sup>®</sup>)
10. *BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster city, EUA)
11. Brometo de etídio ( $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$ ) P.M. 394,3 (Sigma<sup>®</sup>)
12. Cloreto de magnésio 50 mM ( $\text{MgCl}_2$ ) (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
13. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen<sup>®</sup>)
14. Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, CO., EUA)
15. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen<sup>®</sup>)
16. Dióxido de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) P.M. 60,08 (Sigma<sup>®</sup>)
17. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)
18. dNTP Set (100 mM), 4 x 250  $\mu\text{L}$ ; 25  $\mu\text{mol}$  cada (100 mM dATP solution, 100 mM dCTP solution, 100 mM dGTP solution, 100 mM dTTP solution) (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)
19. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) P.M. 288,38 (Synth<sup>®</sup>)
20. Fosfato de sódio dihidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) P.M 177,99 (Merck<sup>®</sup>)
21. Fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) P.M. 155,99 (Reagen<sup>®</sup>)
22. Fosfato de sódio dibásico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) P.M. 141,96 (Synth<sup>®</sup>)
23. Glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) P.M. 180,16 (Reagen<sup>®</sup>)
24. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica<sup>®</sup>)
25. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab<sup>®</sup>)
26. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL<sup>®</sup>)

27. Metanol, P.A. (CH<sub>3</sub>OH) P.M. 32,04 (Alkimia<sup>®</sup>)
28. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) MolliFw1 (*forward*; 5'-CCGTCAAACYATGGGAGC - 3'; [nt] 1-20); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
29. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) MolliRv1 (*reverse*; 5'-GTGYCCCGCCMTACTCAGG - 3'; [nt] 847-866); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
30. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) MybovisFw2 (*forward*; 5'-GTACACTTGTCTTTTATCACTATA - 3'; [nt] 1-20); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
31. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) MybovisRv2 (*reverse*; 5'-AAGGTATCTCGCTTTATGTCCT - 3'; [nt] 488); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
32. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) MygenitFw3 (*forward*; 5'-CGTATTGATTCATCGAGTAAT - 3'; [nt] 1-20); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
33. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) MygenitRv3 (*reverse*; 5'-ATGGTGTCTCGCTCGACT - 3'; [nt] 296); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
34. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) UdivFw4 (*forward*; 5'-TGGTCGGATTCTATTTAGTT - 3'; [nt] 1-20); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) UdivRv4 (*reverse*; 5'-TGGCTACTGAGATGTTTCAC - 3'; [nt] 404); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
36. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) P3 (*forward*; 5'-GCTGTGGGAAGCGGTACG - 3'; [nt] 351-368); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
37. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) P4 (*reverse*; 5'-GTCGACTATGGCCTTGTGTGC - 3'; [nt] 817-796); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)
38. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) P5 (*forward*; 5'-ACGGTCATATGGTACAAGGACAGCG - 3'; [nt] 394-422); 200 pmol (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>)

39. PCR-buffer (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies™)
40. PCR DNA and Gel Band Purification (Invitrogen Life Technologies™)
41. Platinum Taq DNA Polymerase 500 units (Invitrogen Life Technologies™)
42. Proteinase K (Fungal) 100 mg/mL - 20 mg/mL (GibcoBRL, invitrogen Life Technologies™)
43. QuantIT™ dsDNA BR assay kit (Invitrogen Life Technologies™)
44. Sacarose, P.A. – sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) P.M. 342,31 (Reagen®)
45. Triton x-100 (J.T. BAKER®)

## ANEXO B

### Soluções e Tampões

- **Diluição de dNTP**

- Solução estoque (100 mM) – 250 µL de cada dNTP
- Solução uso (10 mM) – 10 µL da solução estoque + 90 µL de água ultrapura

- **Gel de agarose 2%**

- 0,5-1 g agarose
- 50 mL de tampão TBE 1x
- 25 µL de brometo de etídio

- **Hidratação da sílica**

- 60 g de sílica (SIGMA<sup>®</sup>)
- Adicionar 500 mL de água bidestilada autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 450 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Ajustar o pH (pH 2,0) com HCl fumegante
- Aliquotar

- **Proteinase K**

- Proteinase K 100 mg
- Água bidestilada autoclavada q.s.p. 5 mL
- Aliquotar em tubos de 1,5 mL
- Armazenar a temperatura - 20°C

- **SDS 10%**

- 5 g de dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S)
- Água bidestilada q.s.p. 50 mL

- **Solução L6**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 mL de Triton x100

- **Solução L2**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose – sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) 45%
- Água bidestilada q.s.p. 100 mL

- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**

- Tris 107,78 g
- Ácido bórico 55,03 g
- EDTA 7,45 g
- Água bidestilada q.s.p. 1 litro
- Ajustar o pH (pH 8,4)

- **Tampão salino fosfato (PBS) pH 7,2**

- 137mM cloreto de sódio (NaCl)
- 3mM cloreto de potássio (KCl)
- 8mM fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub>)
- Água bidestilada autoclavada q.s.p. 1L

## ANEXO C

### Protocolos e Técnicas

- **Extração do ácido nucleico pela associação das técnicas SDS 10%, Proteinase K e sílica/isotiocianato de guanidina, descrito por Boom et al. (1990).**

#### *Suspensão swabs vulvovaginais*

- *swabs* vulvovaginais
- 500  $\mu$ L de PBS
- Homogeneizar em *vórtex*
- Centrifugar a 1500 x *g* / 15 min a 4°C
- Utilizar 250  $\mu$ L do sobrenadante para extração

#### *Extração do ácido nucleico*

##### Fase I – SDS 10% e proteinase K

- 250  $\mu$ L da suspensão *swab* vulvovaginal
- Adicionar 50  $\mu$ L de SDS 10%
- Adicionar 10  $\mu$ L de proteinase K
- Homogeneizar em *vórtex*
- Banho-maria 56 °C / 30 min
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s

##### Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

- Adicionar 500  $\mu$ L da solução L6
- Adicionar 25  $\mu$ L de sílica hidratada
- Homogeneizar em *vórtex*
- Agitar em temperatura ambiente / 30 min
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500  $\mu$ L de solução L2

- Homogeneizar em *vórtex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500  $\mu$ L de solução L2
- Homogeneizar em *vórtex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 1000  $\mu$ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vórtex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000  $\mu$ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vórtex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000  $\mu$ L de acetona P. A. gelada
- Homogeneizar em *vórtex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60°C (aproximadamente 2 min)
- Adicionar 50  $\mu$ L de água DEPC
- Homogeneizar em *vórtex*
- Banho-maria 56°C / 15 min
- Homogeneizar em *vórtex*
- Centrifugar 13.000 x *g* / 4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500  $\mu$ L
- Estocar -20°C até a utilização

- **Semi nested-PCR** para amplificação da sequência do gene que codifica a glicoproteína D ( gD) do envelope do BoHV-1.

- *Mix* de pré desnaturação

<b>Reagentes</b>	<b>Volumes (<math>\mu</math>L)</b>
<i>Primer</i> P3 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> Pa (20 pmol)	1
Aguá DEPC	3
DNA extraído	5
Volume final	10

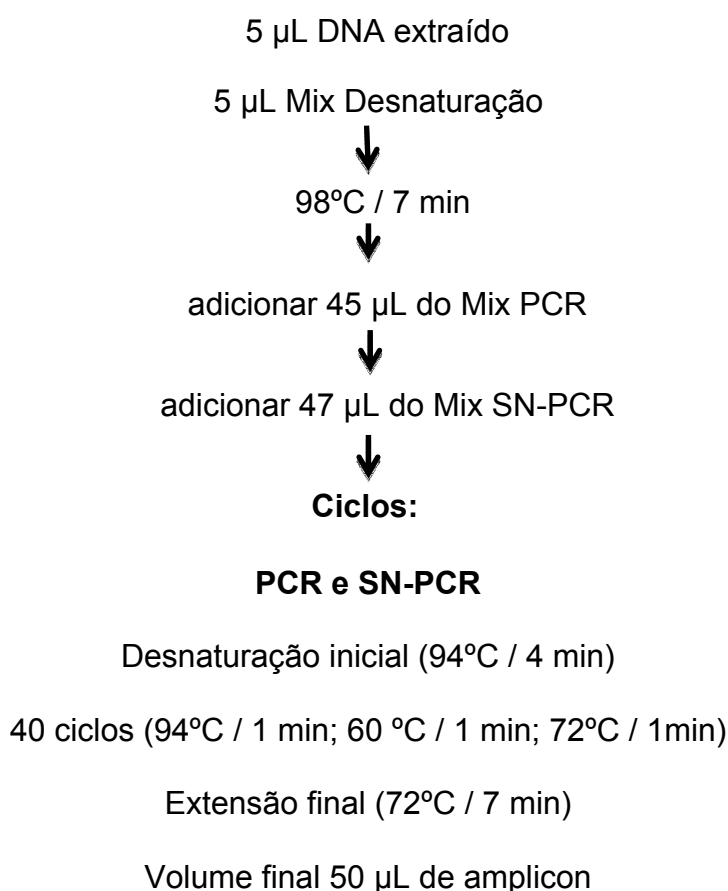
- *Mix* de PCR

<b>Reagentes</b>	<b>Volumes (<math>\mu</math>L)</b>
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Primer</i> P3 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> P4 (20 pmol)	1
<i>Platinun</i> ®Taq DNA Polymerase (2,5 U/ $\mu$ L)	0,5
DMSO 8%	3,2
Aguá DEPC	28,8
Produto da desnaturação	5
Volume final	50

- *Mix de Semi nested-PCR*

<b>Reagentes</b>	<b>Volumes (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl <sub>2</sub>	1,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Primer</i> P3 (20 pmol)	1
<i>Primer</i> P4 (20 pmol)	1
<i>Platinun</i> ®Taq DNA <i>Polymerase</i> (2,5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,5
DMSO 8%	3,2
Aguá DEPC	30,8
Produto da PCR	3
Volume final	50

- **Esquema do programa de *Semi nested-PCR* para amplificação da sequência do gene que codifica a glicoproteína D (gD) do envelope do BoHV1.**



### **Eletroforese em gel de agarose a 2%**

- 1 g de agarose
- 50 mL TBE *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4
- 25 µL de brometo de etídio (0,5 µg / mL)
- São utilizados 5 µL do *amplicon* e 1 - 2 µL do tampão de amostra. A eletroforese sob voltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes ocorre em aproximadamente 50-90 min.

#### **• Purificação de produto de PCR excisado do gel**

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL;
2. Adicionar 3 µL do *Gel Solubilization Buffer* (L3) para cada 1 mg de gel;
3. Incubar o tubo a 50°C /15 min, homogeneizando a cada 3 min;
4. Centrifugar a 12.000 x *g* / 30s;
5. Transferir amostra solubilizada para um tubo coletor com coluna;
6. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1min;
7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo;
8. Adicionar 500 µL do *Wash buffer* (W1) na coluna com tubo coletor;
9. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1 min;
10. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo;
11. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1-2 min;
12. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
13. Adicionar 30 µL do *Elution buffer* (E5);
14. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
15. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1 min.
16. Proceder com a etapa de quantificação ou estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C.

#### **• Quantificação de produto de PCR**

1. Preparar a solução Quant-iT™ *Working Solution* diluindo o reagente Quant-iT™ em *Buffer* Quant-iT™ 1:200. São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100;
2. Homogeneizar em *vórtex*;
3. No microtubo das amostras adicionar 198 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 2 µL do DNA purificado;

4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190  $\mu\text{L}$  da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 10  $\mu\text{L}$  do padrão 0;
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190  $\mu\text{L}$  da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 10  $\mu\text{L}$  do padrão 100;
6. Homogeneizar os microtubos em *vórtex* por 2-3 s;
7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min;
8. Realizar a leitura usando Qubit™ fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, EUA);
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.

ANEXO D  
Lista de Softwares

- *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*  
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- *BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool*  
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- *MEGA package software version 5.1*  
(<http://www.megasoftware.net/>)
- *BioEdit software version 7.0.8.0*  
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
- *GeneRunner software 3.05*  
(<http://www.generunner.net/>)