

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA ANIMAL

**MICOPLASMOSE EM BOVINOS DE APTIDÃO LEITEIRA:
Fatores predisponentes para a ocorrência e manifestação da
síndrome da vulvovaginite granular.**

Josefa Moreira do Nascimento Rocha
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

GOIANIA
2009

JOSEFA MOREIRA DO NASCIMENTO-ROCHA

**MICOPLASMOSE EM BOVINOS DE APTIDÃO LEITEIRA:
Fatores predisponentes para a ocorrência e manifestação da
síndrome da vulvovaginite granular.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Ciência Animal, junto à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:
Sanidade Animal

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

Comitê de Orientação:
Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade
Dr. Jaison Pereira de Oliveira

GOIÂNIA
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GT/BC/UFG**

N244m Nascimento-Rocha, Josefa Moreira.
Micoplasmose em bovinos de aptidão leiteira [manuscrito]: fatores predisponentes para a ocorrência e manifestação da síndrome vulvovaginite granular / Josefa Moreira Nascimento-Rocha. - 2009. xi, 134 f. : il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Lúcia Gambarini Meirinhos.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2009.
Bibliografia.
Inclui lista de tabelas, figuras e quadros.
Anexos.

1. Bovino – Doenças 2. *Ureaplasma diversum* 3. *Mycoplasma bovis* 4. *Mycoplasma bovis* 5. Vulvovaginite I. Título.

CDU: 619:616.9:636.2

OFEREÇO

Aos meus filhos, ANDRÉ, DANIEL, LÍVA e THIAGO, simplesmente por me compreenderem e por aceitarem que por eles eu estou disposta a tentar quantas vezes for preciso.

DEDICO

A *MARIA LUCIA*, por ser mulher, mãe, professora, amiga, colega, irmã, parceira, colaboradora, instrutora e também – orientadora.

À *MARIA APARECIDA* e *JOÃO MOREIRA*, progenitores da mente, do coração e da alma...

À *TALITHA* e *MIGUEL*, frutos que revigoram a árvore da vida.

Ao *CLÁUDIO*, companheiro das últimas horas.

AGRADECIMENTOS

Sinceros Agradecimentos:

A Deus, pelos dons que me emprestaste e aos mentores espirituais que energizam estes dons;

Aos participantes das bancas de avaliação;

À Universidade Federal do Tocantins, por ter proposto o DINTER;

À Universidade Federal de Goiás, por ter aceito o DINTER;

Ao Prof. Dr. José Neuman Miranda Neiva, por viabilizar recursos junto ao MCT/CNPq/CT-Infra/CT-CASADINHO/UFT;

Ao Comitê de Orientação, pela disponibilidade franca e oportuna;

Aos amigos:

- ✓ Gustavo Feliciano Resende da Silva – Médico Veterinário/PDPL
- ✓ Svetlana Ferreira Lima – Acadêmica de Medicina Veterinária/UFG
- ✓ Prof^a. Dr^a. Regiani N. Gagno Pôrto – Escola de Veterinária/UFG
- ✓ Prof^a. Dr^a. Maria Auxiliadora Andrade – Escola de Veterinária/UFG
- ✓ Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho – Escola de Veterinária/UFG
 - ✓ Prof. M.Sc. João Maurício Lucas Gordo – Escola de Veterinária/UFG
- ✓ M.Sc. Ubirajara Oliveira Bilego – Médico Veterinário/COMIGO
- ✓ Med. Vet. João Moreira do Nascimento - Agropecuarista
- ✓ Prof. Dr. Marco Antonio Viu – Escola de Veterinária – UFG/Jataí
- ✓ Maria Lurdes Luz Carvalho – Técnica de Laboratório/UFG
- ✓ Prof^a. Dr^a. Débora Pereira Garcia Melo – Escola de Veterinária/UFG
- ✓ Prof^a. Dr^a. Helcileia Dias Santos – Escola de Veterinária/UFT, que ofereceram o melhor de si, doando simplesmente pelo prazer de fazê-lo, contribuindo com a força física ou intelectual, no aprimoramento desta Tese;

Aos produtores rurais que permitiram visitar seus rebanhos leiteiros;

Aos docentes e funcionários da Escola de Veterinária da UFT e UFG, que participaram da transmissão de valores morais e intelectuais, para a execução deste Doutorado.

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

E ainda que distribuísse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria...” (1 Coríntios 13).

SUMÁRIO

	pp.
CAPITULO I	
ASPECTOS RELACIONADOS À MICOPLASMOSE EM BOVINOS: FATORES PREDISPOANTES PARA A OCORRÊNCIA E MANIFESTAÇÃO DA SÍNDROME DA VULVOVAGINITE GRANULAR.	
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
	25
1.1. MANEJO E PRODUTIVIDADE	27
1.2. FATORES DE RISCO PARA DISTÚRBIOS REPRODUTIVOS	29
1.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA APLICADA AOS FATORES DE RISCO	32
1.4. MICRORGANISMOS QUE COMPROMETEM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA	33
1.4.1. Micoplasmoses	38
1.4.2. <i>Mycoplasma spp</i>	40
1.4.3. <i>Ureaplasma diversum</i>	43
1.4.5. Patogenicidade dos micoplasmas	48
1.4.6. Outros microrganismos	50
1.5. VULVOVAGINITE	52
1.6. FATORES DE RISCO PARA A MICOPLASMOSE	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

CAPITULO II - FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM FÊMEAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO.

1. INTRODUÇÃO	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO	75
2.2. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE MATERIAL	76
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
3. RESULTADOS	78
4. DISCUSSÃO	84
5. CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

CAPÍTULO III - FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma spp* E *Ureaplasma diversum* EM LESÕES DE VULVOVAGINITE GRANULAR EM VACAS EM LACTAÇÃO.

1. INTRODUÇÃO	96
2. MATERIAL E MÉTODOS	103
2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO	103
2.2. ANIMAIS, OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE MATERIAL	105
2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	107
3. RESULTADOS	108
4. DISCUSSÃO	122
5. CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
CONSIDERAÇÕES FINAIS	134

LISTA DE FIGURAS

p.

CAPITULO II - FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM FÊMEAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO.

FIGURA 1. Frequência de amostras positivas e negativas para *Ureaplasma diversum* nas amostras de muco vulvovaginal, conforme positividade para *E. coli* e CCS ($\times 10^3$) e CBT($\times 10^3$), nas nove propriedades estudadas. 79

FIGURA 2. Frequência de amostras positivas e negativas para *U. diversum* conforme presença ou ausência de *E. coli*, grau de lesão e amostras mista com *Mycoplasma spp*, dos rebanhos testados. 83

CAPÍTULO III - FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma spp* E *Ureaplasma diversum* EM LESÕES DE VULVOVAGINITE GRANULAR EM VACAS EM LACTAÇÃO.

FIGURA 1. Distribuição radial dos pontos de correlação baseados nos cálculos de coeficiente de correlação de Spearman, para isolamento microbiológico das amostras testadas. *Mycoplasma spp* (UM1); *Mycoplasma spp* e *Ureaplasma diversum* (UM3). 113

FIGURA 2. Distribuição radial dos pontos de correlação baseados nos cálculos de coeficiente de correlação de Spearman, para o isolamento microbiológico das amostras testadas. *Ureaplasma diversum* (UM2); Negativo para micoplasmas (UM4). 113

FIGURA 3. Distribuição radial dos pontos de correlação baseados nos cálculos de coeficiente de correlação de Spearman, para os Graus da lesão de vulvovaginite e os outros parâmetros estudados. Negativo para lesão (GL1); Lesão de Grau I (GL2), Lesão de Grau II (GL3), Lesão de Grau III (GL4). 117

FIGURA 5. Frequência dos resultados de diagnóstico sorológico para *Neospora caninum* e *Leptospira interrogans* associado aos resultados para *Mycoplasma spp* (UM1); *Ureaplasma diversum* (UM2); *Mycoplasma spp* e *Ureaplasma diversum* (UM3); Negativo para micoplasmas (UM4), realizado nas vacas de produção dos seis retiros. 120

FIGURA 6. Características mais freqüentes dos animais soropositivos para *Leptospira* onde foram estimado a Moda dos animais com o isolamento para *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM), Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL), padrão racial (RA), reposição animal (RE), produtividade (PL), condição da vaca (CV), quimioterapia (TR), escore corporal (EV), com o escore do ordenhador (EH), o escore de higiene da sala de ordenha (ES) e o escore do manejo (SC) em relação aos animais pertencentes aos seis sistemas de produção avaliados. 120

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II - FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM FÊMEAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO. p.

- TABELA 1. Dados obtidos nas nove propriedades visitadas com o número de vacas por rebanho, número de colheitas, a produção diária de leite, o sistema e o tipo de ordenha, a infra-estrutura dos galpões e o controle de qualidade do leite 78
- TABELA 2. Fatores observados nas nove propriedades pesquisadas para as chances de risco de ocorrência do *Ureaplasma diversum*, conforme condições reprodutivas das vacas, grau de lesão e ocorrência de *Mycoplasma* spp e *E. coli*. 80
- TABELA 3. Freqüência de amostras positivas e negativas para *Ureaplasma diversum* nas amostras de muco vulvovaginal, conforme condição produtiva, reprodutiva, tipo e sistema de ordenha, das vacas testadas. 81

TABELA 5. Frequência de Amostras positivas e negativas para *U. diversum* 82 nas amostras de muco vulvovaginal, conforme presença ou ausência de *E. coli*, isolamento misto de *Mycoplasma spp* e *U. diversum* (UM) e grau de lesão das vacas testadas.

TABELA 6. Razão de chance de positividade para o *Ureaplasma diversum* 83 nas amostras de muco vulvovaginal, conforme a presença de *E. coli* e o grau de lesão de vulvovaginite observados nas vacas testadas.

CAPÍTULO III - FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma spp* E *Ureaplasma diversum* EM LESÕES DE VULVOVAGINITE GRANULAR EM VACAS EM LACTAÇÃO.

TABELA 1. Valores unitários dos dados relacionados às condições 108 produtivas, incluindo categoria das vacas, padrão racial, produção láctea, condição gestacional e corporal, para cada sistema de produção avaliado, em relação aos seis retiros testados.

TABELA 2. Dados relacionados ao número de animais utilizados, lotação da 109 sala de ordenha, média do escore do ordenhador, da sala de ordenha, do manejo dos animais e a frequência de animais positivos para lesões de vulvovaginite (VVG).

TABELA 3. Dados relacionados à presença de vulvovaginite e o isolamento 110 positivo para *Mycoplasma spp* e *U. diversum*, em relação aos seis retiros testados.

TABELA 4. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes 110 *Mycoplasma spp* e *U. diversum* (UM) e os graus de lesão (GL)), para os seis retiros.

TABELA 5. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes 111 *Mycoplasma spp* e *U. diversum* (UM) e raça (RA) e forma de reposição animal (RE), para os seis retiros..

TABELA 6. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes 111 *Mycoplasma spp* e *U. diversum* (UM) e a produção de leite (PL) e a condição reprodutiva da vaca (CV), para os seis retiros.

TABELA 7. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes <i>Mycoplasma</i> spp e <i>U. diversum</i> (UM) e o escore corporal da vaca (SV), para os seis retiros.	111
TABELA 8. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes <i>Mycoplasma</i> spp e <i>U. diversum</i> (UM) e o tratamento (TR) e o escore de higiene da sala de ordenha (ES), para os seis retiros.	112
TABELA 9. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes <i>Mycoplasma</i> spp e <i>U. diversum</i> (UM) e o escore do manejo (SC) e o escore de higiene pré e pós ordenha (EH), para os seis retiros.	112
TABELA 10. Estimativa de risco (OR) de acordo com a positividade para <i>U. diversum</i> em muco vulvovaginal, apresentando ou lesões de VVG, determinados pelo escore de condição corporal (SV) escore de manejo com os animais (SC) e produção leite diária (PL).	115
TABELA 11. Estimativa de risco (OR) de acordo com a positividade para <i>U. diversum</i> em muco vulvovaginal, apresentando ou lesões de VVG, de acordo com as raças.	115
TABELA 12. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e a raça (RA) e o tipo de reposição animal (RE), para os seis retiros.	116
TABELA 13. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e a condição reprodutiva da vaca (CV), para os seis retiros.	116
TABELA 14. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e o tratamento (TR) e a produtividade (PL), para os seis retiros.	116
TABELA 15. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e o escore corporal das vacas (SV), para os seis retiros.	116
TABELA 16. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e o escore de higiene da vaca (EH) e o escore de higiene da sala de ordenha (ES), para os seis retiros.	118

- TABELA 17. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e o escore do manejo em relação aos animais (SC), para os seis retiros. 118
- TABELA 18. Frequência de sorologia positiva para *Neospora caninum* e sorovares da *Leptospira interrogans*, feito por detecção sorológica de anticorpos específicos, do rebanho pertencente aos seis retiros testados. 119
- TABELA 19. Correlação (r) de Pearson comparando o diagnóstico sorológico positivo para *Neospora caninum* e *Leptospira interrogans* com o isolamento para *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM), Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL), padrão racial (RA), reposição animal (RE), produtividade (PL), condição da vaca (CV), quimioterapia (TR), escore corporal (EV), com o escore do ordenhador (EH), o escore de higiene da sala de ordenha (ES) e o escore do manejo (SC), para os seis retiros 121

LISTA DE QUADROS**CAPITULO I - ASPECTOS RELACIONADOS À MICOPLASMOSE EM BOVINOS: FATORES PREDISPOANTES PARA A OCORRÊNCIA E MANIFESTAÇÃO DA SÍNDROME DA VULVOVAGINITE GRANULAR.**

p.

QUADRO 1. Diferentes espécies animais com diagnóstico positivo para micoplasmas, segundo diferentes autores. 34

QUADRO 2. Espécies do gênero *Mycoplasma* de ocorrência em mamíferos de interesse zootécnico, doença desenvolvida e distribuição geográfica. 35

CAPÍTULO II - FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma* spp E *Ureaplasma diversum* EM LESÕES DE VULVOVAGINITE GRANULAR EM VACAS EM LACTAÇÃO.

QUADRO 1. Legenda das siglas utilizadas para a elaboração da TABELA de cálculos do teste de correlação de Spearman. 107

QUADRO 2. Procedimentos de manejo utilizados nos sistemas de produção, antes e após a ordenha, utilizados como parâmetro de avaliação do escore de manejo para cada unidade produtora. 109

ANEXOS

CAPITULO II - FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM FÊMEAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO.

p.

ANEXO 1. Ficha de inquérito epidemiológico aplicado junto às unidades produtoras de leite visitadas. 93

CAPITULO I

ASPECTOS RELACIONADOS À MICOPLASMOSE EM BOVINOS: FATORES PREDISPOANTES PARA A OCORRÊNCIA E MANIFESTAÇÃO DA SÍNDROME DA VULVOVAGINITE GRANULAR.

RESUMO

A queda dos índices reprodutivos é medida pela redução no número de bezerras nascidas que reflete imediatamente na redução da produção de leite e na rentabilidade comercial da propriedade. A repercussão administrativa é o incremento das despesas de manutenção com vacas secas, maiores taxas de descarte e maior número de doses de sêmen por concepção. Parâmetros relacionados ao nível de higiene do úbere e do sistema de ordenha e os critérios ambientais globais como o controle na pressão de sucção da ordenhadeira, o sistema de ventilação para os animais assim como a higiene na sala de ordenha, contribuem de forma satisfatória para o controle de patógenos transmissíveis entre os animais de produção. Estudo sobre monitoramento de rebanho demonstrou que o tempo do intervalo de partos aumenta significativamente em vacas de primeira lactação com vulvovaginite, mas a ocorrência da lesão não apresentou associação com os casos de descarte voluntário. Pesquisas sobre a probabilidade de introdução de agentes infecciosos em rebanhos livres da doença identificaram que os fatores de risco significativos para esta disseminação estiveram relacionados com a devolução de animais que foram retirados para comercialização, proximidade entre pastos de diferentes propriedades e principalmente pela vestimenta do veterinário ou de visitantes. Ao analisar os fatores de risco para a ocorrência de determinada doença as causas multifatoriais são consideradas. As análises de regressão para identificar fatores de risco normalmente consideram os efeitos multifatoriais e o desfecho. Assim, a identificação do fator de risco consiste em comparar o padrão de distribuição das variáveis dependentes entre os níveis de ocorrência da doença. O *M. canadense* ainda é pouco conhecido nos processos patológicos da reprodução. O *M. bovis* é altamente adaptado aos bovinos, porém já foi isolado em amostras de búfalos, pequenos ruminantes e humanos. O *M. bovis genitalium* foi relacionado com patologias do sistema reprodutivo há mais de três décadas e foi considerado como o agente primário da vulvovaginite. A vulvite granular promovida pelo *U. diversum* foi demonstrada tanto em animais vacinados quanto nos não vacinados. O agente apresenta fatores de interação celular, a habilidade de se ligar à superfície de membrana do hospedeiro e ainda mecanismos biológicos de escape à resposta imunológica apresentada pelo hospedeiro. Tanto animais jovens quanto adultos são susceptíveis. A transmissão ocorre pela introdução de animais portadores, sêmen contaminado e contato com as secreções genitais de animais infectados.

Palavras-chave: Bovino, ordenha, reprodução, *Ureaplasma diversum*.

ABSTRACT

The reduction of reproductive rates is measured by the reduction in the number of calves born that immediately reflected in the reduction of milk production and profitability of commercial property. The effect is the increased administrative costs of maintenance with dry cows, higher rates of rejection and a higher number of doses of semen for conception. Parameters related to the level of hygiene of the udder and the milking system and environmental criteria as the overall control on the suction pressure of the milking, the ventilation system for livestock and hygiene in the milking parlor, contribute to the satisfaction of the control of pathogens transmissible among livestock. Study on monitoring the herd showed that the time of calving interval increases significantly in the first lactation cows with vaginitis, but the injury was not associated with cases of voluntary discharge. Research on the likelihood of introduction of infectious agents into herds free of the disease found that the significant risk factors for this spread were related to the return of animals that were removed for marketing, proximity between pastures of different properties and especially the clothing of a veterinarian or visitors. When analyzing the risk factors for the occurrence of a disease the causative factors are considered. Regression analysis to identify risk factors usually consider the multifactorial effects and outcome. The identification of the risk factor is to compare the pattern of distribution of the dependent variables between the levels of occurrence of the disease. Infections with mycoplasma (*Mollicutes*) in farm animals, have historical importance and continuing today interfering with livestock productivity. The *M. Canadense* is still little known in the pathological processes of reproduction. The *M. bovis* is highly adapted to cattle, however has been isolated in samples of buffalo, small ruminants and humans. The *M. bovis genitalium* was related to diseases of the reproductive system for more than three decades and was considered as the primary agent of vaginitis. The granular vulvitis sponsored by the *U. diversum* was demonstrated both in animals vaccinated as in unvaccinated. The agent has to interact with cellular factors, the ability to bind to the surface membrane of the host and even biological mechanisms to escape immune response submitted by host. Young animals and adults are susceptible. Transmission is by the introduction of carrier animals, semen and contact with infected genital secretions of infected animals.

Key-words: Bovine, milking, reproduction, *Ureaplasma diversum*.

CAPITULO I

ASPECTOS RELACIONADOS À MICOPLASMOSE EM BOVINOS: FATORES PREDISPOANTES PARA A OCORRÊNCIA E MANIFESTAÇÃO DA SÍNDROME DA VULVOVAGINITE GRANULAR.

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

O sistema agro-industrial do leite no Brasil é considerado um dos mais importantes do país, principalmente devido a sua grande participação no âmbito social e na melhoria de qualidade de vida do cidadão. A cadeia produtiva do leite movimenta anualmente cerca de US\$10 bilhões, emprega 3 milhões de pessoas das quais, mais de 1 milhão são produtores, administrando um dos maiores rebanhos do mundo, com grande potencial para abastecer o mercado interno e exportar. Neste processo de expansão, três importantes fatores modificaram o perfil do setor leiteiro nacional, principalmente na última década: O aumento da produção, a redução do número de produtores e o decréscimo dos preços recebidos pelos produtores.

Ao ser classificado como o sexto maior produtor de leite bovino, pela *Food and Agriculture Organization (FAO)*, em 2004, o Brasil passou a ocupar uma importante posição mundial, participando da lista dos dez primeiros e nas Américas perdendo somente para os Estados Unidos, que foi considerado o maior produtor de leite, em 2005, com aproximadamente 15% da produção mundial (COSTA, 2005). O IBGE disponibiliza o registro de maior índice produtivo ocorrido em 2005, de 1.191 litros por vaca ordenhada/ano (IBGE, 2005). Apesar desta expressiva produção de leite, quando comparado aos demais países a média da produtividade do Brasil (1.137 litros/vaca/ano), foi considerada menor que a dos Estados Unidos, Canadá, Argentina e Uruguai (COSTA, 2005). Entretanto, nas condições produtivas locais em 2007, o Brasil produziu 25 milhões de toneladas

de leite de vaca, atingindo aproximadamente 4,8% da produção mundial (SANTOS et al. (2009). PONCHIO et al. (2004) citaram que no período de 1961 a 2003 os dados da FAO mostraram taxa de crescimento de 3,38% ao ano na produção leiteira no Brasil, e FERNANDES et al. (2004) afirmaram que somente na década de 90, a produção de leite do Brasil cresceu 36,5%, concentrando-se, principalmente, nas regiões Sul e Sudeste, as quais são responsáveis, aproximadamente, por 70% da produção nacional. Estes autores avaliaram a evolução da pecuária leiteira nas diversas regiões do País, com exceção da Região Norte por sua baixa expressividade que representa apenas 5% da produção nacional, e perceberam que os maiores incrementos de produção ocorreram nas Regiões Centro-Oeste (81,3%) e Sul (50,3%), indicando que a atividade leiteira se desenvolveu mais, neste período, nestas duas regiões.

A análise obtida por Estados da Federação, revela que dentre os maiores produtores de leite, destacam-se os três estados da Região Sul, dois da Região Sudeste e um da Região Centro-Oeste. Destes, os que apresentaram maior incremento percentual na produção de leite foram em primeiro lugar Goiás (104,65%), seguidos do Paraná (55,10%) e Santa Catarina (54,23%) (FERNANDES et al., 2004). Em termos gerais a produtividade média por região, em 2006, destacou o Estado de Goiás com 9,86 litros/vaca em lactação/dia, seguidos de Minas Gerais (12,32), Paraná (18,91) e Rio Grande do Sul (18,77), adotando-se para este cálculo a conversão da produção anual para produção por período de lactação de 10 meses (LOPES, 2007).

Os dados do IBGE mostram que o rebanho brasileiro aumentou de 153.058.275 para 199.752.014 de cabeças, que o número de vacas ordenhadas foi reduzido e mesmo assim a produção total cresceu 7,1 milhões de litros no

mesmo período. Isto significa que a produtividade média em litros por vaca por ano aumentou chegando a 9,96% de crescimento total (PONCHIO et al., 2004). Este cenário da pecuária leiteira, que coincide com tendências também verificadas em outras atividades agropecuárias, apresenta a redução do número das unidades de produção (vacas leiteiras) e o aumento da produtividade (volume de leite por lactação) (MASSUQUETO et al., 2007). Por outro lado, esse aumento da produtividade tem sido associado à maior incidência de enfermidades (BUENO et al., 2006), que podem levar a prejuízos econômicos para o produtor; leite com maiores riscos de presença de resíduos de antibióticos e a percepção negativa da atividade leiteira junto à população. As mudanças da economia e a abertura do mercado brasileiro trouxeram maior concorrência para os elos da cadeia do leite, vindo a exigir maior eficiência produtiva e qualidade. Os diferentes fatores da produção de leite atuam e se interrelacionam de maneira diversa nos vários sistemas de produção e, conseqüentemente, podem ser considerados mais ou menos importantes, dependendo do sistema adotado (KRUG, 2001). Os principais fatores que interfere nos sistemas são alimentação, custos de produção, padrão genético, assistência técnica, gerenciamento e sanidade (SILVA & ROMERO, 2009).

Fatores relacionados ao animal, ao meio ambiente e aos procedimentos de manejo comprometem a saúde reprodutiva das fêmeas e conseqüentemente ocorre a redução da produtividade (SOUZA, et al., 2005), mas o desequilíbrio na sanidade do rebanho, em particular as infecções que direta ou indiretamente comprometem o trato reprodutivo da fêmea e do macho, assim como o desenvolvimento do embrião e do feto, representa a principal interferência na eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos bovinos de aptidão leiteira

(JUNQUEIRA et al., 2006). O controle reprodutivo destes animais deve ser feito através do acompanhamento rotineiro, levando em consideração todas as ocorrências reprodutivas ao longo de sua história. Este controle tem como finalidade, principalmente, conhecer o intervalo de partos das vacas, identificar aquelas que repetem estros, suspeitar da influência do touro ou do sêmen sobre a fertilidade do rebanho, observar a ocorrência e frequência de abortos, bem como conhecer a data de cobertura, partição e secagem. Acompanhar a vida reprodutiva das vacas é de extrema importância, pois problemas e ineficiências poderão ser detectados e corrigidos, aumentando assim a produtividade na atividade leiteira (FERNANDES et al., 2004).

Fatores de risco predisponentes aos processos infecciosos do aparelho reprodutivo são manejo pré-parto inadequado, distúrbios endócrinos e nutricionais, condições sanitárias precárias, infecções pós-partição (ANDRADE, et al., 2005), fatores ambientais de estresse, especialmente o calórico (FERREIRA & FERNANDES, 2000) ou de exposição a microrganismos potencialmente patogênicos adquiridos principalmente durante a estação de monta (GAMBARINI et al., 2009) .

A mastite e a vulvovaginite são distúrbios sanitários que direta ou indiretamente refletem na eficiência reprodutiva. Estas enfermidades são geralmente de transmissão horizontal mas podem também estar associadas a deficiências ou problemas humanos como maus hábitos higiênicos e modo de tratar os animais, à higienização e manutenção dos equipamentos de ordenha, ao local onde os animais permanecem e circulam, ao patógenos e fatores que favorecem a sua presença dos animais, como lesões dos tetos, à água usada para lavar equipamentos e preparar soluções de limpeza, de tal maneira que no

rebanho com desordens reprodutivas, todos esses itens devem ser analisados para determinar a causa ou as causas predisponentes (DEL FAVA et al., 2003).

A implantação de programas sanitários no rebanho bovino leiteiro, cujas medidas preventivas consistem no controle de trânsito de bovinos, inseminação artificial com sêmen livre de patógenos e monitoramento semestral das enfermidades, possibilita a prevenção destas enfermidades. Por outro lado, a presença do agente no ecossistema da propriedade e os fatores de risco associados favorecem a disseminação destas enfermidades no rebanho, sendo necessário associar práticas de manejo sanitário e zootécnico para evitar a disseminação e o contágio.

A eficiência reprodutiva do rebanho é um dos componentes mais importantes no desempenho econômico da propriedade de produção de leite (LEITE et al., 2001). Se a vaca permanece vazia por período muito prolongado, mesmo que continue produzindo leite, o volume produzido se torna cada vez mais reduzido (RAJALA-SCHULTZ & GRÖHN, 1999). A queda dos índices reprodutivos é medida pela redução no número de bezerros nascidos que reflete imediatamente na redução da produção de leite e na rentabilidade comercial da propriedade (GRÖHN & RAJALA-SCHULTZ, 2000). A repercussão administrativa é o incremento das despesas de manutenção com vacas secas, maiores taxas de descarte e maior número de doses de sêmen por concepção (LEITE et al., 2001). O ganho potencial resultante do investimento na taxa reprodutiva é cinco vezes maior que o esperado pelo aumento da qualidade do leite e três vezes maior que o esperado pelo melhoramento genético, sendo apenas inferior aos ganhos que podem ser obtidos pela melhoria na nutrição. Ou seja, investir em produtividade, associando tecnologia, manejo e sanidade ainda é a forma mais inteligente de administrar um unidade de produção (FERNANDES et al, 2004).

Entretanto até mesmo os investimentos em tecnologia devem ser medidos quanto aos impactos sanitários no rebanho leiteiro. Com o propósito de aumentar a produtividade, sistemas automáticos de ordenha foram desenvolvidos. Gradualmente, ao longo dos últimos anos esta técnica de ordenha tem se tornado rotina na grande maioria das propriedades. A integração destes sistemas exigem porém, atenção para com o planejamento da ordenha. Neste sentido, maiores

investigações sobre a produção de leite com boa qualidade e o desenvolvimento de técnicas higiênicas para possibilitar a desinfecção e tratamento dos tetos, pode minimizar assim a propagação de patógenos entre os animais que compartilham o mesmo sistema (ROSSING & HOGEWERF, 1997). Com a propagação desta técnica, novas preocupações foram adicionadas para a manutenção da qualidade sanitária do leite e do rebanho. A relação entre as práticas de ordenha e a diversidade de microrganismos que podem ser detectados como promotores de distúrbios reprodutivos nas fêmeas de produção, está diretamente relacionada com aspectos higiênicos e de manejo durante o processo. Estudos relatam a importante associação entre o aumento dos índices produtivos e a maiores incidências de distúrbios sanitários resultando em aumento nos custos de produção (EMANUELSON & OLTENACU, 1998). Parâmetros relacionados ao nível de higiene do úbere e do sistema de ordenha e os critérios ambientais globais como o controle na pressão de sucção da ordenhadeira, o sistema de ventilação para os animais assim como a higiene na sala de ordenha, contribuem de forma satisfatória para o controle de patógenos transmissíveis entre os animais de produção (VERDIER-METZ et al., 2009).

Um fator preponderante para qualificar a eficiência produtiva é também a detecção precoce e precisa do estro. É descrito que a eficiência reprodutiva diminuiu em vacas mais velhas, nas vacas de alta produção, e nas vacas que pariram na estação seca. Portanto, o registro dos dados produtivos em planilhas organizadas interferem positivamente no controle produtivo do rebanho (COLEMAN et al., 1985).

Menor eficiência reprodutiva resulta em redução na produção de leite, tendo em vista que o período de lactação, na propriedade leiteira, será mantido elevado quando o intervalo entre partos for, fisiologicamente, cada vez mais reduzido (RAJALA-SCHULTZ & GRÖHN, 1999). O papel do médico veterinário tem impacto fundamental no desempenho reprodutivo real do rebanho leiteiro, especialmente quando os diagnósticos falso-positivo ou falso-negativo apresentam efeitos pronunciados no processo de descarte da vaca de produção (COLEMAN et al., 1985).

1.1. MANEJO E PRODUTIVIDADE

Em se tratando de produtividade, alguns fatores podem comprometer o desempenho de um rebanho, mesmo que o elemento saúde não seja o mais relevante. O mau desempenho reprodutivo é descrito como uma das principais causas para o descarte das vacas de produção (COLEMAN et al., 1985). O abate de vacas de produção é uma questão complexa, pois muitos fatores estão envolvidos. Vacas leiteiras são abatidas por doença aguda e infertilidade, ou seja, falha reprodutiva é uma das principais razões para o abate. No entanto, ao tomar uma decisão, o fazendeiro considera, pelo menos, cinco razões principais para este desfecho: Paridade, produção de leite; estágio da lactação, estado de concepção e ocorrência de doenças (GRÖHN & RAJALA-SCHULTZ, 2000). Um estudo sobre monitoramento de rebanho demonstrou que o tempo do intervalo de partos aumenta significativamente em vacas de primeira lactação com vulvovaginite, mas a ocorrência da lesão não apresentou associação com os casos de descarte voluntário (BLUM et al. 2008).

O manejo adequado é fundamental para a produtividade leiteira, pois dele depende os bons resultados conseguidos com os demais itens abordados como alimentação, higiene e sanidade e outros como genética e fator racial. Estes fatores podem ser amenizados com o estabelecimento de boas práticas de manejo, recomendados por MONTEIRO NOVO & SCHIFFLER (2006):

- Ordenha tranquila em horários fixos;
- proporcionar conforto ao animal;
- mão-de-obra treinada;
- possuir água de boa qualidade;
- evitar ordenhar entre 10 e 16 horas, quando a temperatura é mais alta;
- esterqueiras devem estar longe do local de ordenha;
- evitar que o animal deite logo após a ordenha.

O equipamento de ordenha e o ato em si, seja mecânico ou manual, podem influenciar direta ou indiretamente na saúde da glândula mamária. As possíveis flutuações no sistema de vácuo da ordenhadeira que proporcionam o movimento de leite entre os copos coletores (teteiras), podem facilitar a difusão de microrganismos entre vacas e entre os quartos mamários do mesmo animal. A

ordenhadeira, a mão do ordenhador, práticas de higiene e lesões nos tetos são fatores importantes que expõem a superfície dos tetos aos microrganismos patogênicos contagiosos, sendo estes transmitidos de animais infectados para não infectados durante o processo de ordenha (AMARAL et al., 2004).

A anti-sepsia dos tetos após a ordenha, a adoção de linha de ordenha com fornecimento de alimento durante e após a ordenha e a higienização do equipamento de ordenha com água quente e/ou treinamento dos ordenhadores podem ser considerados possíveis fatores protetores para a eficiência produtiva (SOUZA et al., 2005).

Segundo CASTRO (2006) para avaliar a propriedade, o rebanho e o animal, devem ser considerados os seguintes elementos:

- Tipo de exploração: Corte, leite e mista;
- tipo de criação: Confinada, semi-confinada e extensiva;
- utilização de inseminação artificial: Com ou sem touro;
- número de fêmeas com idade \geq 24 meses;
- tamanho do rebanho;
- promiscuidade: Criação de ovinos/caprinos, equinos, suínos, cães, aves;
- presença, na propriedade, de animais silvestres (qualquer um): Cervídeos, capivaras e outros: Ausência e presença;
- destino de fetos abortados e placenta: Não faz nada, alimenta porco/cão, enterra, joga em fossa, queima;
- comprar reprodutores de qualquer origem;
- comprar reprodutores em exposições;
- comprar reprodutores em leilões e feiras;
- comprar reprodutores de comerciantes;
- comprar reprodutores de outras fazendas;
- abate de animais na própria fazenda;
- aluguel de pastos a outros;
- utilização de pastos compartilhados;
- existência de áreas alagadiças acessíveis ao gado;
- utilização de piquetes de parição;
- existência de assistência veterinária.

Em relação ao animal, além dos parâmetros reprodutivos, comportamentais e manejo, deve-se verificar principalmente a presença ou não de sinais clínicos e o diagnóstico laboratorial da infecção. Sistemas de ordenha, quando mal projetados, deficientes em ventilação e drenagem apresentam conseqüências danosas à saúde da glândula mamária e da vulva. Mudanças de temperatura e umidade que podem influenciar indiretamente na tríade de fatores determinantes (hospedeiro, agente e/ou meio ambiente) afetam a susceptibilidade à mastite e vulvovaginite (PRESTES et al., 2002). Em relação ao ambiente, é de grande importância a observação das fontes de infecção. Uma determinada fonte pode ser formada por seres, tanto animados como inanimados, que albergam o agente, e dos quais ele se transfere para o novo hospedeiro.

1.2. FATORES DE RISCO PARA DISTÚRBIOS REPRODUTIVOS

Na história natural das doenças, onde ainda não se considera a interferência médica, a fase da susceptibilidade é identificada como a situação em que não é conhecido o diagnóstico, porém já é possível estabelecer os fatores predisponentes para que a doença ocorra. Dependendo da existência ou não destes fatores – denominados então de Fatores de Risco ou de Proteção, alguns indivíduos estarão mais ou menos propensos do que outros a determinadas doenças. Os fatores de risco correspondem às circunstâncias ambientais ou populacionais, herdadas ou adquiridas que conferem maior probabilidade da doença ocorrer (PEREIRA, 2005).

Vários trabalhos têm sido realizados para verificar os fatores de risco associados às infecções que comprometem a produtividade animal. Estudos sobre fatores de risco para as infecções mamárias e genitais, bem como seu impacto econômico, foram realizados em países de pecuária leiteira desenvolvida. Neles, a maioria dos rebanhos é composta por animais de alta produção, criados em sistemas de confinamento total ou parcial (SOUZA, et al. 2005). Avaliando fatores de risco para a ocorrência da mastite, pesquisadores detectaram que vacas em regime semi-intensivo foram mais afetadas; as vacas tiveram maior risco de aquisição de infecção da glândula mamária durante a longa estação chuvosa, início da lactação, vacas mais velhas, vacas com várias parições,

presença de lesões no úbere, presença de ectoparasitas e exposição a infecções prévias (BIFFA et al., 2005).

Em relação à contagem de células somáticas (CCS) foi constatado que o aumento da CCS no leite foi influenciado principalmente por fatores estressantes, dentre eles o calor, redução da secreção láctea, estágio e ordem de lactação avançados e principalmente quando houve infecção intramamária (BUENO et al., 2005).

Avaliando as condições físicas para fêmeas de aptidão leiteira, WILDMAN et al. (1982) relataram que a melhor eficiência produtiva foi expressada pelas fêmeas com escore corporal 2,5 e menor eficiência foi detectada nas fêmeas com escore corporal 3,3. Segundo os autores, animais com escore corporal mais alto, não estariam convertendo a gordura corporal para a produção de leite. Por outro lado, os animais com maior produção de leite apresentaria menor taxa de concepção, devido ao estresse sofrido para os mecanismos de conversão já citados (GÁBOR et al., 2008).

A análise dos possíveis patógenos transmitidos, principalmente durante a estação de monta, verificou-se que agentes causadores da Leucose, Língua azul, Febre catarral maligna, Brucelose, Tuberculose, Leptospirose, Campilobacteriose, Tricomonose, Encefalite espongiiforme e Micoplasmose são passíveis de serem transmitidas durante a estação de monta ou por sêmen contaminado. WENTINK et al. (2000) recomendam a aquisição de animais livres da doença, higiene dos manipuladores e cuidados na desinfecção de equipamentos utilizados nos procedimentos de inseminação artificial, mas alertam que os riscos permanecem em virtude dos meios ambientais de transmissão.

Pesquisas sobre a probabilidade de introdução de agentes infecciosos em rebanhos livres da doença identificaram que os fatores de risco significativos para esta disseminação estiveram relacionados com a devolução de animais que foram retirados para comercialização, proximidade entre pastos de diferentes propriedades e principalmente pela vestimenta do veterinário ou visitantes (VAN SCHAİK et al., 2002).

Estudando os fatores de risco para a síndrome da repetição de serviços em vacas de leite, MOSS et al. (2002) descreveram que as vacas maiores que cinco anos ou as primíparas, especialmente se tiveram bezerros

natimortos e aquelas com cistos ovarianos e metrite são mais predispostas. Verificaram também que os métodos para aumentar o pico de lactação influenciaram negativamente para a repetição de serviços.

Vários são os fatores estressantes que comprometem os índices reprodutivos. Desde os ambientais como frio, calor, vento e umidade, quanto aqueles relacionados ao manejo como, densidade animal, interação entre espécies diferentes, manipulação ou transporte dos animais, mudança na rotina e até traumas físicos ou comportamentais (MOBERG, 1975). Pesquisas sobre a relação entre o estresse térmico e a eficiência reprodutiva revelaram que o tempo de duração e a intensidade do estro são significativamente influenciados pelo calor. Métodos de resfriamento e uso da transferência de embriões foram sugeridos, neste caso, para que os índices reprodutivos fossem mantidos (JORDAN, 2003).

TILLARD et al. (2008) analisaram os fatores relacionados ao balanço nutricional e desordens sanitárias que poderiam influenciar no tempo para o primeiro serviço e sucesso na concepção. O sucesso na concepção ficou em torno de 26 e 27%, e a incidência de doenças relacionadas com a reprodução entre 7,2 e 18,3%, nos animais observados. Através da avaliação do escore corporal e de dados hematológicos, os autores verificaram que o escore corporal não apresentou influência sobre o tempo do primeiro serviço e no sucesso da concepção. A retenção de envoltórios fetais apresentou influência negativa sobre o parâmetro observado. Os autores verificaram também o impacto negativo da importação de animais sobre o tempo de serviço e sucesso na concepção, justificado em parte pelas dificuldades de aclimatação.

1.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA APLICADA AOS FATORES DE RISCO

Ao analisar os fatores de risco para a ocorrência de determinada doença o aspecto multifatorial deve ser considerado. As análises de regressão para identificar fatores de risco normalmente consideram os efeitos multifatoriais e o desfecho. Assim, a identificação do fator de risco consiste em comparar o

padrão de distribuição das variáveis dependentes entre os níveis de ocorrência da doença (SARGEANT et al., 1998).

Embora a maioria das variáveis seja auto-explicativa, algumas necessitam ser definidas para aumentar a compreensão das informações coletadas. A variável dependente (VD) mede o fenômeno que se estuda e que se quer explicar. Neste caso a doença associada com a presença do agente se torna o elemento mais importante na mensuração epidemiológica, portanto, na análise de um problema de eficiência reprodutiva, as variáveis dependentes consideradas poderiam ser divididas em: Características reprodutivas, como intervalo parto concepção (IPC), intervalo entre parto e o primeiro estro (IPPE), intervalo entre estros (IEE), intervalo de partos (IDP), idade ao primeiro parto (IdPP) e idade ao primeiro estro (IdPE); e características produtivas, como produção de leite (PL), calculada com base na produção diária e corrigida para 300 dias, número de crias (NC) e longevidade em anos (L), considerada como a idade em que os animais apresentaram o último parto (LEITE et al., 2001).

As variáveis independentes (VI) são utilizadas para explicar a(s) variável (eis) dependente(s). Porém é preciso entender que mesmo encontrando relação entre as variáveis isto, não necessariamente, significa relação causal (CUNHA et al., 2006). Como variáveis independentes são considerados aborto, natimorto, distocia, retenção de placenta e vulvovaginite (LEITE et al., 2001).

Os critérios de inclusão envolvem todas as definições da população-alvo identificável além de outras definições de interesse relevante para a inclusão no estudo, por exemplo, "*fêmeas bovinas em fase reprodutiva que apresentem sinais clínicos de vulvovaginite granular*". Os critérios de exclusão que, em simultâneo com os critérios de inclusão, definem a população de estudo, estão, geralmente, relacionados com aspectos que podem confundir os efeitos de interesse da investigação (*fêmea em puerpério*) ou aspectos relacionados com a segurança ou incapacidade de acesso aos animais (SAMPAIO & MANCINI, 2007).

O grau de associação entre duas variáveis é observado a partir da análise da correlação. O coeficiente de correlação é uma mensuração estatística que permite relacionar a variável dependente com uma ou mais variáveis independentes. Os coeficientes de correlação mais utilizados são de Pearson, de

Spearman, de Kendall e o de Gamma. A correlação de Spearman estabelece a mensuração não paramétrica entre variáveis que permitem descrever relações entre duas variáveis sem fazer nenhuma inferência sobre a distribuição de frequência das variáveis (BOLBOACĂ & JÄNTSCHI, 2006). A correlação de Spearman é utilizada como uma ferramenta para indicar o grau de concordância da variabilidade espacial obtida em diferentes tempos. A correlação de Spearman baseia-se na ordenação de duas variáveis sem qualquer restrição quanto a distribuição de valores. Este método apresenta três vantagens distintas relativamente ao método paramétrico: Não assume que todos os erros ocorrem na direção de Y; não assume que todos os erros são normalmente distribuídos e o resultado não é afetado pela presença de valores aberrantes (NUNES & CAMÕES, 2005).

Outro sistema de análise é utilizado quando o propósito é o delineamento observacional. Neste modelo, três ou mais casos da história natural da doença ou anormalidade são descritos. Estes casos podem ser coletados e estudados retrospectivamente ou prospectivamente em qualquer período de tempo. Neste modelo utilizou-se o Estudo de Caso-controle, o qual é observacional e usualmente retrospectivo, onde se investiga os indivíduos com determinada doença ou anormalidade (casos) para comparação com sujeitos com características semelhantes, mas sem a doença ou anormalidade (controles). Estabelece-se a comparação de efeito para causa e geralmente permite uma aproximação do risco relativo (*odds ratio*) para a investigação do tipo caso-controle parte do “efeito” para chegar as “causas”. O *odds ratio* é uma estimativa do risco relativo (RR) mensurada em um determinado tempo e mede a força de associação entre as variáveis. É utilizado como medida de associação em estudos caso-controle e em estudos transversais controlados (RUMEL, 1986). No estudo de caso-controle o cálculo é inverso em relação aos estudos anteriores (ensaio clínico e coorte): Busca-se quantificar a proporção de expostos, nos grupos de casos e de controles. Neste tipo de investigação, o risco relativo é estimado pelo cálculo do *odds ratio*, também denominado “razão dos produtos cruzados”. As vantagens do *odds ratio* são: Baixo custo relativo; alto potencial analítico; adequado para estudar doenças raras, os resultados são obtidos rapidamente e quando a doença (ou morte) é pouco frequente (menos de 5%

para alguns autores ou 10% para outros), o *odds ratio* é uma boa estimativa do risco relativo (CORDEIRO, 2005)

1.4. MICRORGANISMOS QUE COMPROMETEM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

De acordo com CARVALHO (2006), o investimento em diagnóstico, controle e defesa sanitária, atendendo aos parâmetros nacionais e internacionais de qualidade higiênica e sanitária do rebanho e do leite, é um dos fatores que devem ser corrigidos para que a produtividade nacional seja ainda mais progressiva. Os distúrbios da reprodução de origem infecciosa em bovinos são multietiológicos. Diferentes microrganismos como bactérias, vírus, protozoários e mesmo micotoxinas, atuando de forma isolada, ou mais freqüentemente em associações, podem ser responsáveis pela sobreposição de sinais clínicos fazendo com que o diagnóstico clínico seja de difícil realização (JUNQUEIRA et al., 2006).

Os patógenos envolvidos nos distúrbios reprodutivos são classificados em dois grupos distintos: Contagiosos e ambientais. Os agentes contagiosos necessitam do animal para a sobrevivência, multiplicam-se na glândula mamária, canal do teto, sobre a pele ou na cavidade uterina. São transmitidos de uma vaca infectada a outra, ou de um quarto infectado a outro, ou da vulva para o úbere e deste para os tetos, principalmente durante a ordenha (PRESTES et al., 2002), enquanto os ambientais estão distribuídos por todas as superfícies sólidas, líquidas ou gasosas com que o animal possa ter contato (RIBEIRO et al., 2009).

Os microrganismos do ambiente são encontrados em todos os rebanhos e podem ser recuperados da água (AMARAL et al., 2004), fezes, materiais usados como cama, pele dos animais e várias outras fontes. Os principais representantes desse grupo são: *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* e outros estreptococos (que não *S. agalactiae*) e *Pseudomonas aeruginosa* (RIBEIRO et al., 2009). Porém, em relação aos microrganismos contagiosos, o animal é o próprio reservatório e a contaminação do trato urogenital pode fazer-se por três vias: A ascendente, a partir da microbiota fecal e uretral, a hematogênea, em que a bactéria contamina o sangue e infecta secundariamente o aparelho urogenital e a linfática, que é uma via duvidosa de disseminação que pode ter,

contudo, algum papel nas infecções, especialmente as crônicas (CORREIA et al., 2007). O suporte laboratorial pode identificar animais com infecções crônicas ocasionadas por microrganismos patogênicos dos gêneros *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp, *Corynebacterium* sp e *Mycoplasma* sp ou dos considerados ambientais como bactérias coliformes, *Streptococcus uberis*, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas* sp, fungos e algas (OLIVEIRA, 2006), os quais se disseminam principalmente pelas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha (RIBEIRO et al., 2009). Os resultados laboratoriais contribuem sensivelmente para a tomada de decisão no processo preventivo (COENTRÃO et al., 2008). Uma vez contaminado, o animal tem grande probabilidade de se tornar um portador assintomático. Ao se tornar reservatório, este animal é posicionado centralmente no ciclo biológico de manutenção das doenças infecciosas, sendo através dele que o agente mantém sua vitalidade e se perpetua. São considerados reservatórios tanto os casos clínicos quanto os portadores (FORATTINI, 2004).

1.4.1. Micoplasmoses

As infecções por micoplasmas (*Mollicutes*) em animais de produção, possuem importância histórica e persistem interferindo na produtividade pecuária. Esses microrganismos estão associados a diversas doenças, cujos sinais clínicos podem ser na forma aguda, porém, normalmente são de caráter crônico. Os micoplasmas são potenciais causadores de patologias no sistema respiratório, urogenital, glândula mamária, articulações, sistema nervoso e conjuntiva ocular (BUZINHANI et al., 2007).

Quando a micoplasmose é introduzida no rebanho, geralmente por um animal portador e clinicamente inaparente, ela se estabelece em animais de várias idades e se torna difícil de ser erradicada. Animais infectados por vários meses ou anos passam a se comportar como reservatórios. O contato com secreções respiratórias, vias genitais ou inseminação com sêmen contaminado se torna a forma comum para a disseminação do agente (NICHOLAS & AYLING, 2003). Há ainda considerações significativas sobre a presença de micoplasmas em embriões produzidos *in vitro*, representando até 100% de ocorrência destes

aderidos à zona pelúcida. Neste contexto considera-se que o agente tem sido transmitido em larga escala através das técnicas de transferência de embriões tendo em vista que este método de reprodução está sendo aplicado em rotina cada vez mais crescente (THIBIER, 2001; NASCIMENTO et al., 2005).

Os micoplasmas estão relacionados a distúrbios reprodutivos em várias espécies animais, inclusive em humanos. Nestes, é citada a ocorrência do *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* promovendo distúrbios que levam à infertilidade principalmente em mulheres (MONTAGNER et al., 2007). Alguns artigos que relatam sua ocorrência em animais, distribuídos por vários países, estão listados no QUADRO 1 e as espécies de micoplasmas que foram relacionadas com problemas infecciosos em animais domésticos aparecem listadas no QUADRO 2.

QUADRO 1. Diferentes espécies animais com diagnóstico positivo para micoplasmas, segundo diferentes autores.

Espécie infectada	Referências
Flora genital normal de cães.	DOIG et al., (1981).
Chimpazés aptos para reprodução	TAYLOR-ROBINSON, et al. (1987).
Trato reprodutivo de cavalos	SPERGSER et al. (2002).
Balanite e vulvite em ovinos	KIDANEMARIAM et al. (2005).
Em sêmem de homem infértil	GDOURA et al. (2007).
Embriões de aves	LIERZ et al. (2007).
Suínos com agalaxia	BARROS et al. (2008).

Entre as espécies de micoplasmas isoladas em amostras de bovinos, o *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* são considerados de maior importância para as infecções do trato urogenital (BUZINHANI et al., 2007; LYSNYANSKY et al., 2009).

A presença do *Mycoplasma* spp e do *U. diversum* está associada à ocorrência da síndrome vulvovaginite granular, independente do grau de lesão observado na mucosa vulvovaginal. A infecção do rebanho por esse microrganismo pode afetar de maneira significativa a eficiência reprodutiva, pelo aumento do número de vacas repetidoras de estro (BUZINHANI et al., 2007).

QUADRO 2. Espécies do gênero *Mycoplasma* de ocorrência em mamíferos de interesse zootécnico, doença desenvolvida e distribuição geográfica.

Espécie do <i>Mycoplasma</i>	Doença desenvolvida	Distribuição geográfica
<i>M. conjunctivae</i>	Ceratoconjuntivite infecciosa	Brasil
<i>M. agalactiae</i>	Agalactia contagiosa	Jordania
<i>M. bovis</i>	Pneumonia, mastite, artrite, otite, meningite e aborto	Cosmopolita
<i>M. mycoides</i>	Pleuropneumonia contagiosa bovina	África
<i>M. dispar</i>	Pleuropneumonia	Europa e Norte da America
<i>M. canis</i>	Pneumonia	Europa e Norte da America
<i>M. californicum</i>	Mastite, pneumonia	Europa, USA
<i>M. bovigenitalium</i>	Endometrite "branca", infertilidade, anormalidade seminal	Europa, Norte da África e USA
<i>U. diversum</i>	Vulvite granular, endometrite e pneumonia	Cosmopolita
<i>M. alkalescens</i>	Ainda desconhecida mas possivelmente pneumonia	Europa e Norte da America
<i>M. canadense</i>	Vulvovaginite granulopapular	Israel
<i>M. bovirhinis</i>	Provavelmente inofensivo, porém pode exacerbar a pneumonia	Cosmopolita
<i>M. bovoculi</i>	Ceratoconjuntivite contagiosa	Europa e Norte da America
<i>M. alvi</i>	Ainda desconhecida	Europa e Norte da America
<i>M. verecundum</i>	Ainda desconhecida	Europa e Norte da America
<i>M. bovine group 7</i>	Mastite e artrite	Austrália e Suíça

Fonte: CARDOSO et al. (2000); CERDÁ et al. (2000); ALMEIDA NETO et al. (2004); NICHOLAS et al. (2006); AL-MOMANI et al.(2008); LYSNYANSKY et al.(2009).

A ocorrência de aborto por estas bactérias tem sido diagnosticada em frequência muito baixa, refletindo em associação pouco esclarecida entre o aborto e a presença destes agentes, entretanto a vulvovaginite granular, promovida principalmente pelo *U. diversum* parece ser a manifestação mais claramente evidenciada. Foi sugerido que o isolamento de *U. diversum* a partir de amostras de muco vulvovaginal demonstram menor significado clínico do que aquelas obtidas a partir do cérvix ou corpo do útero (RUHNKE et al., 1978).

Os micoplasmas são suscetíveis às condições adversas do meio. A sua lise ocorre por choque osmótico, contato com detergentes, alcoóis e anticorpos específicos ligados ao complemento. São, também, sensíveis às variações bruscas de pH e temperatura. São anaeróbios facultativos, são os

menores e mais simples procariontes que conseguem ter vida livre na natureza; se auto-replicam, dividindo-se por fissão binária. Possuem genoma pequeno – variando de 0,58-1,35 Mb (CHAMBAUD et al., 1999), constituído por DNA circular de fita dupla e RNA; o genoma é cerca de seis vezes menor que o da *E. coli*, o que torna sua capacidade biossintética limitada (ROTTEM, 2003), explicando a existência saprofítica ou parasitária dos micoplasmas.

O cultivo de micoplasmas é dificultado principalmente quando a obtenção da amostra clínica, o método da coleta, as condições de transporte ou os meios nutrientes não atendem às exigências de sobrevivência e multiplicação destes agentes fora do ambiente biológico. Atualmente as técnicas de PCR tem sido preferidas para o diagnóstico em virtude destas dificuldades nos procedimentos de cultivo, isolamento e identificação específica do agente em questão (BUZINHANI et al., 2007).

Através da bacteriologia é possível isolar as várias espécies de micoplasmas, porém não é possível identificá-los especificamente. Portanto, sem o uso de sorologia ou técnicas em biologia molecular, considera-se positivo para o gênero *Mycoplasma* e identifica-se o *U. diversum* já que esta é a única espécie de ocorrência em bovinos (CARDOSO & VASCONCELOS, 2004). O cultivo dos micoplasmas requer técnicas altamente especializadas e cada um dos isolamentos foi considerado como ocorrência casual (KUNDSIN et al., 1978).

Métodos sorológicos para a investigação, especialmente do *M. bovis* apresentaram maior sensibilidade ao se utilizar a técnica de antígenos recombinados com proteína A de superfície, expressadas como proteína de adesão na parede da *E. coli*, tornando o ELISA capaz de detectar anticorpos específicos do *M. bovis* a partir de amostras de bovinos naturalmente infectados (NICHOLAS & AYLING, 2003). Os procedimentos bioquímicos para a identificação das espécies de micoplasmas incluem: Hidrolise da uréia, fermentação da glicose, hidrólise da arginina, atividade de fosfatase, formação de filmes e bolhas, redução do tetrazolio, liquefação de soro coagulado e hidrolise da caseína.

Mycoplasma spp descarboxila arginina enquanto o *U. diversum* é reconhecido especificamente pela atividade da urease (POVEDA, 1998). Outra propriedade que diferencia o *U. diversum* dos demais micoplasmas é sua

tolerância ao pH, isto porque a amônia produzida durante a urease aumenta o pH, cuja reação pode ser avaliada por métodos colorimétricos como a espectrofotometria, analisado especialmente com a adição de vermelho de fenol ao meio de cultivo (BLOOMSTER & LYNN, 1981).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* não possuem parede celular, o que as torna resistentes às penicilinas, cefalosporinas, vancomicina e outros antibióticos que interferem na síntese da parede celular. Devido à ausência de parede, o *U. diversum* é fracamente corado pela coloração Gram. A membrana citoplasmática é clássica e corresponde ao modelo de Singer e Nicolson, fornecendo uma estrutura em mosaico fluido. A medida é de 7-10 nm de espessura e possui grande flexibilidade funcional. É constituída por uma dupla camada de fosfolipídios com proteínas flutuantes na sua interface. Dentre estas proteínas, são encontradas as proteínas de superfície para a aderência bacteriana na célula-alvo. A membrana é rica em colesterol; e o seu papel é manter a fluidez da membrana às variações moderadas de temperatura. No entanto, esta membrana contém alguns ácidos graxos poliinsaturados facilmente oxidáveis. Esta característica parece ser importante na patogênese e adesão a uma célula-alvo (BEY, 2006).

A ausência da parede celular faz dos micoplasmas microrganismos mais simples que todas as outras bactérias Gram-negativas, entretanto ambos possuem grande quantidade de lipoproteínas em seus envelopes, porém nos micoplasmas estas moléculas estão fixadas no folheto externo da membrana, enquanto que nas bactérias Gram-negativas elas estão ancoradas no folheto interno da membrana. A presença de grandes quantidades de lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa é uma propriedade que distingue a maioria das bactérias Gram-negativas, porém a membrana plasmática de algumas espécies de micoplasmas também apresentam lipoglicanos, que, embora sejam claramente diferentes dos LPS, representam repetições de oligossacarídeos e compartilham com os LPS fixados na membrana lipídica (CHAMBAUD et al., 1999).

1.4.2. *Mycoplasma* spp

As espécies de micoplasmas que desenvolvem patologias nas diversas espécies animais já foram listadas no QUADRO 2, porém outras considerações serão acrescentadas, especialmente devido a relação entre estes agentes e a ocorrência de vulvovaginite em bovinos. Os micoplasmas citados como promotores da vulvovaginite são o *M. bovis*, *M. bovigenitalium* e *M. canadense* (LYSNYANSKY et al., 2009).

NICHOLAS et al. (2006) cita que o *M. canadense* ainda é pouco conhecido nos processos patológicos da reprodução, porém análises morfológicas de colônias coradas pelo Giemsa, observadas por microscopia óptica, em microscopia eletrônica e através de testes bioquímicos utilizando inibidores do crescimento, inibidores de precipitação, imunoeletroforese e testes de anticorpos fluorescentes descreveram o *M. canadense* como uma nova espécie de micoplasma envolvido em casos de mastite e outras infecções do trato reprodutivo (LANGFORD et al., 1976) e este agente foi citado mais recentemente como envolvido nos casos de vulvovaginite em vacas de rebanhos de Israel (LYSNYANSKY et al., 2009).

Foi descrito o isolamento do *M. bovis* pela primeira vez em 1961 e destacada a sua capacidade de se espalhar rapidamente no rebanho, especialmente durante os procedimentos de ordenha (JASPER et al., 1984) e ocorrendo principalmente em casos de pneumonia, artrite, ceratoconjuntivite, endometrite, salpingite, oophorites e aborto (NICHOLAS & AYLING, 2003). No Brasil, a primeira citação consta de 1996 e dados mais recentes mostram o índice de 5,83% do *M. bovis* nas infecções mamárias (PRETTO et al., 2001) e 57,14% em muco vaginal de fêmeas bovinas com problemas reprodutivos (NASCIMENTO et al., 2005). O *M. bovis* pode ser introduzido em rebanhos livres da doença pela aquisição de animais portadores. No rebanho o microrganismo é disseminado durante a ordenha, aerossóis e secreções de animais com distúrbios respiratórios e genitais. As vias hematogena ou linfática são responsabilizadas pela disseminação dos micoplasmas de um órgão infectado para outro (PRETTO et al., 2001).

O *M. bovis* é altamente adaptado aos bovinos, porém já foi isolado em amostras de búfalos, pequenos ruminantes e humanos (NICHOLAS & AYLING, 2003). A transmissão venérea ocorre principalmente nos casos em que *M. bovis*, *M. canadense* e *M. bovisgenitalium* estejam envolvidos. A mastite promovida por *Mycoplasma* spp parece ser uma patologia emergente (FOX et al., 2003) e as perdas devido à mastite bovina causada por *M. bovis* podem ser maiores do que as doenças respiratórias. Estimativas feitas nos Estados Unidos da América apontam até US\$108 milhões em perdas por ano com taxas de infecção de 70% em um único rebanho. Na Grã-Bretanha, quando o *M. bovis* foi detectado em 1970 e na Irlanda no início de 1990, inicialmente apresentou-se com a ocorrência de mastite, artrite severa e manifestação da forma mais comum: A pneumonia (NICHOLAS et al., 2006). Estudos *in vitro* mostraram que a resistência do *M. bovis* aos antibióticos usados frequentemente tem aumentado, ou seja, a maioria das cepas já são resistentes à oxitetraciclina, comumente utilizada. As fluoroquinolonas continuam sendo mais eficazes *in vitro*, embora seja improvável que o patógeno seja completamente eliminado. Assim, deve-se considerar que é preciso tratar todos os animais do rebanho, assim como abater os positivos para impedir que estes se tornem reservatórios. O sucesso do tratamento de bezerros com doença respiratória promovida pelo *M. bovis* pode ser feito com antimicrobianos do tipo triamida tulatromicina (NICHOLAS et al., 2006). A profilaxia com antibióticos é geralmente desnecessária, entretanto é observado que em animais tratados a resposta humoral tende a permanecer por mais tempo, sugerindo que a atividade dos anticorpos, isoladamente, raramente é efetiva contra a infecção (NICHOLAS & AYLING, 2003).

O *M. bovisgenitalium* foi relacionado com patologias do sistema reprodutivo há mais de três décadas (LANGFORD, 1975) e foi considerado como o agente primário da vulvovaginite (DOIG et al., 1979). É também importante causador de patologias, especialmente aquelas que influenciam nos índices reprodutivos do rebanho. A vulvite granular associada ao *M. bovisgenitalium* foi descrita pela primeira vez em 1966, apesar dos autores relatarem nesta associação, tendo em vista que a doença só foi reproduzida de forma consistente nos casos em que epitélio vulvar foi levemente escarificado antes da inoculação, e foram poucos os casos diagnosticados a partir das lesões (DOIG et al., 1980).

Trabalhos realizados no Canadá com técnicas de cultivo a partir de amostras do trato reprodutivo e fetais, isolaram *M. bovis genitalium* tanto das secreções vaginais, quanto dos cotilédones de úteros grávidos e do tecido renal de fetos dissecados (LANGFORD, 1975). O *M. bovis genitalium* já foi relacionado também com a ocorrência de mastite (GONZÁLEZ & WILSON, 2003) e endometrite, infertilidade e anormalidades do sêmen (NICHOLAS et al., 2006). Pesquisas feitas com sêmen de reprodutores bovinos verificaram que do total de micoplasmas isolados neste tipo de amostra, de 60 a 100% eram contaminados por *M. bovis genitalium* enquanto que *M. bovis* representou aproximadamente 3% dos isolados (CARDOSO & VASCONCELOS, 2004). Trabalhos realizados nos Estados Unidos relataram o envolvimento do *M. bovis genitalium* nas infecções do tipo vulvovaginite granular, infertilidade e endometrite (GIVENS & MARLEY, 2008). Ao pesquisarem a presença de *Chlamydiae* e *Mollicutes* em sêmen de touros de cinco centrais de inseminação distribuídas por vários estados da Austria, os autores verificaram que a presença do *M. bovis genitalium* ocorreu com diferentes e significativas freqüências acima das encontradas para o *M. bovis* e o *U. diversum* (PETIT et al., 2008a).

1.4.3. *Ureaplasma diversum*

A síndrome da vulvite granular associada à presença do *U. diversum* foi reconhecida pela primeira vez em rebanhos bovinos de Ontário, em 1972 (DOIG et al., 1979) mas o agente foi isolado do trato reprodutivo de bovinos, pela primeira vez em 1967 (DOIG et al., 1980) e suas características biológicas começaram a ser estudadas desde 1969 (SANDERSON et al., 2000). As características genéticas do *U. diversum* isolado em fêmeas bovinas no Brasil ainda são desconhecidas, entretanto apesar de se conhecer pouco de sua genética já se sabe bastante sobre as suas influências patológicas sobre a produtividade do rebanho (BUZINHANI et al., 2006). As investigações sobre a relação entre o *U. diversum* e os distúrbios reprodutivos foram considerados controversos até 1978, pois acreditava-se que estes microrganismos eram comensais e não estavam relacionados com os problemas de infertilidade nos rebanhos (KUNDSIN et al., 1978). Posteriormente foi detectado em amostras de

mucosas cervico-vaginal e sêmen de touros aparentemente sadios. Informações adicionais sugeriram a relação patogênica deste agente com fetos abortados e descargas vulvares anormais, sendo implicado também na ocorrência da vulvovaginite granular em rebanhos. Tanto infecções experimentais quanto naturais demonstraram a ocorrência do *U. diversum* nos casos de epididimite, vesiculite seminal e balanopostite. Foi diagnosticado também em casos de salpingite, endometrite, cervicite, vulvite granular, histórico de infertilidade, morte embrionária e morte neonatal (RUHNKE et al., 1978 e CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994). Por ter sido encontrado freqüentemente em fêmeas bovinas com histórico de aborto, este microrganismo passou a ter importância na sanidade animal. O aborto causado por *U. diversum* é resultado da placentite e da pneumonia fetal que ocorrem principalmente no último trimestre da prenhez (NASCIMENTO & SANTOS, 2003).

A vulvite e vaginite foram periodicamente observadas em novilhas e vacas e a infecção vaginal parece ser mais freqüente nos animais mais jovens, mas tem sido encontrada em animais de qualquer idade. A infecção ocorre tanto nas formas aguda e crônica, resultando em lesões de 1-5 dias após o contato com o microrganismo. Além dos sinais característicos da doença, tais como hiperemia, presença de granulados no epitélio vulvar e vaginal, seguido ou não de corrimento vaginal purulento, os animais revelam alta sensibilidade epitelial e freqüentemente ocorrem manifestações relacionadas com endometrite (DOIG et al., 1980). Estas lesões tendem a desaparecer gradualmente em poucas semanas e o epitélio retorna à normalidade por volta de seis semanas a três meses após a infecção. A reinfecção ocorre frequentemente e a doença tende a se tornar endêmica no rebanho (DOIG et al., 1979).

O *U. diversum* possui fosfolipases na membrana e, possivelmente, a ação direta destas enzimas nos substratos do hospedeiro leva à produção de ácido aracdônico, diacilglicerol e lisofosfolipídeos, substâncias que alteram a biossíntese de prostaglandinas e das funções normais da célula hospedeira. As prostaglandinas são potentes reguladores das atividades celulares, principalmente aquelas que envolvem os processos reprodutivos. Elas são importantes no processo de implantação e manutenção da prenhez, cujo efeito é comprometido durante as infecções pelos ureaplasmas (AMARAL, 2003).

Determinadas espécies de micoplasmas apresentam estrutura externa à membrana constituída de polissacarídeos a qual está envolvida na supressão de várias funções dos macrófagos alveolares e, conseqüentemente, na imunossupressão local (ROTTEM, 2003). Experimentalmente foi verificado que a vacinação com antígenos de *U. diversum* promoveu a produção de altos níveis de IgG nas primeira e segunda inoculações, porém não foram verificadas respostas de IgM e IgA. Em condições naturais, a explicação para que os níveis de IgA não se alterem surge devido ao fato de que a fixação do *U. diversum* é na superfície epitelial, resultando em contato mínimo entre o antígeno e o sistema imunológico (MULIRA & SAUNDERS, 1994).

Estudos realizados sobre a ocorrência do *U. diversum* consideraram como fator de risco para a infecção, os animais mais jovens e com menor número de parições (LÉON et al., 1995). Outros trabalhos demonstraram que o risco relativo associado com a presença e sinais clínicos ou história de aborto ou de repetição de estro são significativamente importantes para os animais que apresentam granulação, hiperemia e grande quantidade de secreção vaginal purulenta (CARDOSO et al., 2000). A presença do *U. diversum* foi relatada em porcentagens semelhantes tanto para as raças Holandesa quanto a Jersey, entretanto, os autores consideraram que as holandesas mais velhas parecem ter eliminado o agente, sugerindo a ocorrência de imunidade relacionada à infecção (LEÓN et al., 1995). Por outro lado, a presença do *U. diversum* pode também induzir a produção de peróxidos que causam danos aos espermatozoides, afetando, portanto, a habilidade de fertilizar ovócitos (MONTAGNER et al., 2007).

Foi verificado experimentalmente que uma das respostas patogênicas da infecção por *U. diversum* é a mortalidade embrionária precoce (KREPLIN et al., 1987). Este microrganismo, quando localizado na vulva, representa uma fonte constante de disseminação. 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 marcada redução da fertilidade (OLIVEIRA FILHO et al., 2005). Em alguns casos o *U. diversum* estimula a síntese de prostaglandina $F_2\alpha$, potente hormônio luteolítico, e em outros casos inibe a síntese da prostaglandina E_2 , um dos principais hormônios relacionados ao reconhecimento materno da gestação. Por outro lado, na

infecção pelo *U. diversum*, ocorre o aumento de interferon γ (INF- γ) que induz a secreção de citocinas pelos macrófagos amplificando a resposta inflamatória. Estes mecanismos fisiológicos induzidos pelos micoplasmas resultam em redução no desempenho reprodutivo das fêmeas de produção (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994)

A vulvite granular causada pelo *U. diversum* foi encontrada tanto em animais vacinados quanto nos não vacinados com fragmentos antigênicos do *U. diversum* (MULIRA & SAUNDERS, 1994), indicando que a vacinação, assim como a antibioticoterapia, são pouco eficientes contra as infecções por micoplasmas. Portanto, a segregação animal e procedimentos sanitários rígidos tornam-se as melhores medidas para prevenir a transmissão do agente entre animais infectados e os não infectados (NICHOLAS & AYLING, 2003). BLUM et al. (2008), trabalhando com efeito da vulvovaginite sobre a produtividade do rebanho, detectou que um dos fatores de risco para a ocorrência da inflamação foi a introdução de animais e a reunião de animais de diferentes sistemas de produção em uma mesma unidade produtora de leite.

1.4.5. Patogenicidade dos micoplasmas

Estes microrganismos têm a capacidade de aderir firmemente na superfície celular. O eficiente mecanismo de aderência é requisito para sua sobrevivência e patogenicidade, evitando, assim, que eles sejam expulsos através de secreções mucosas e do fluxo urinário. Durante o crescimento os micoplasmas liberam metabólitos e enzimas como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio e a amônia, que se acumulam e causam danos aos tecidos do hospedeiro. Estudos por meio de microscopia eletrônica revelam a ocorrência dos micoplasmas formando agregados em torno das células do hospedeiro (MESEGUER et al., 2003). As células mais freqüentemente parasitadas são as do trato respiratório, urogenital e das articulações e, raramente, invadem os tecidos e o sangue. Os micoplasmas patogênicos exibem morfologia filamentosa ou em forma de clava, apresentando uma organela com aspecto de proeminência na extremidade polar da célula. Esta estrutura é composta de proteínas interativas, denominadas adesinas e por proteínas acessórias, que colaboram funcional e estruturalmente

para a mobilização e o aumento das adesinas, permitindo, desta maneira, a adesão dos micoplasmas à superfície das células eucarióticas. A adesão é realizada provavelmente por meio dos sialoglicoconjugados e glicolípídeos sulfatados da célula hospedeira (ROTTEM, 2003; CARVALHO, 2008).

A falta da parede celular facilita a fusão da membrana dos micoplasmas com a do hospedeiro e, embora evidências desta hipótese sejam discutíveis, é considerada como indicativo da interação de estruturas entre a membrana do hospedeiro e do parasita. Essa associação íntima proporciona ao microambiente o aumento na concentração de produtos tóxicos excretados pelo parasita, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais superóxidos (O_2^-) e amônia que se acumulam, causam danos aos tecidos do hospedeiro e induzem à inibição irreversível da catalase endógena. Este metabolismo induz a progressivos danos oxidativos aos constituintes vitais da célula hospedeira (AMARAL, 2003).

Foi descrito que os micoplasmas não apresentam caráter invasivo (POWELL & CLYDE, 1975), porém foi detectado que, dependendo da relação parasito/hospedeiro, os micoplasmas podem se tornar parasitas por excelência (MESEGUER et al., 2003), pois podem não matar a célula e esta situação resulta em estresse, permitindo que a célula se torne mais suscetível a outras infecções e variações ambientais. As interações entre os micoplasmas e o sistema imune do hospedeiro são muito mais complexas do que se poderia esperar em função da simplicidade de suas características estruturais e funcionais. Na verdade, a interação sutil entre os micoplasmas e o sistema imune do hospedeiro é em grande parte resultado das propriedades de seu envelope celular (CHAMBAUD et al., 1999). Quando os micoplasmas se alojam no interior das células do hospedeiro, eles passam a se proteger da reação imunológica. Este mecanismo é discutido como um processo evolutivo do microrganismo melhorando suas habilidades patogênicas (MESEGUER et al., 2003). A patogenicidade dos micoplasmas está relacionada também com a capacidade de produção de resposta imune inflamatória no hospedeiro. Dentre os fatores relacionados com a virulência, foi identificada a tiol peroxidase, que provavelmente protege os micoplasmas contra os peróxidos produzidos por si mesmo ou pelo hospedeiro, e duas nucleases secretadas, envolvidas, possivelmente, na captação de

precursores dos ácidos nucléicos (CORDOVA, 2002). Outro mecanismo de patogenicidade de micoplasmas é o alto grau de especificidade e capacidade de aderência às células do hospedeiro (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994), com preferência pelas células mesenquimatosas que revestem as cavidades serosas, articulações e membranas dos sistemas respiratório, digestivo e urogenital (HIMSWORTH et al., 2009).

Através da observação por microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar que o *M. bovis* e o *M. bovis genitalium*, assim como o *U. diversum*, quando presentes na tuba uterina, causam a diminuição ou o cessamento da atividade ciliar, interferindo na concepção e no desenvolvimento inicial do embrião (SMITS et al., 1994). No mecanismo de fixação aos embriões, foi verificado experimentalmente que estes agentes podem atravessar a zona pelúcida de ovócitos e também se fixarem sobre o acrossoma dos espermatozóides (BIELANSKI et al., 2000). É descrito que os espermatozóides possuem receptores específicos para *U. urealyticum*, os sulfagalactoglicerolipídeos, presentes predominantemente na superfície côncava da cabeça dos gametas, permitindo a fixação destes microrganismos (VIANNA et al., 2004). Estes receptores estão relacionados com a necessidade de fixação ao epitélio da tuba uterina, já demonstrado por BOSCH & WRIGHT JR. (2005). Em mamíferos os espermatozóides permanecem armazenados na porção caudal do ístmo da tuba uterina, e quando ocorre a ovulação, uma parcela destes são liberados e migram em direção à ampola, onde a fertilização deverá ocorrer. Segundo estes autores, há evidências de que a integridade deste reservatório é fundamental para que a função espermática mantenha os padrões ideais de fertilização. Utilizando-se destes fatores de interação celular, a habilidade dos ureaplasmas de se ligar à superfície de membrana do espermatozóide foi demonstrada por VIANNA et al., (2004) assim como a capacidade que o ureaplasma possui de alterar a concentração do esperma, velocidade e motilidade dos espermatozóides levando-os à perda da capacidade de fertilização “in vitro” (MONTAGNER et al., 2007).

Muitas espécies do gênero *Mycoplasma* induzem a produção de citocinas, além disto o *U. diversum* tem sido responsabilizado pelo recrutamento de células linfóides para os sítios inflamatórios durante as respostas agudas ou crônicas (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994). As toxinas produzidas por cepas

de *M. mycoides* subsp. *capri*, demonstraram ser ativas na produção de efeitos citopáticos em cultivos de células embrionárias da traquéia de galinhas. A presença de endotoxinas foi demonstrada em cinco espécies de *Acholeplasma* e caracterizadas como lipoglicanos, moléculas complexas constituídas de vários açúcares neutros, amino açúcares, glicerol e ácidos graxos. Estas moléculas não somente demonstraram uma estrutura diferente dos lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias Gram negativas, como também foram consideradas mais potentes quando comparadas ao LPS da *E. coli* (BUZINHANI et al., 2006).

Em inoculações experimentais foi verificado que os mecanismos patogênicos desencadeados pelas endotoxinas da *E. coli* e dos micoplasmas são basicamente semelhantes, entretanto foi observado que a resposta mediada pelo *U. diversum* é relativamente lenta. A explicação para este evento foi elaborada no pressuposto de que as bactérias são menos potentes como estimuladoras dos processos inflamatórios, quando comparadas com as toxinas elaboradas por elas (MOSS et al., 2002). Um dos eventos patogênicos mais relevantes talvez seja a capacidade dos micoplasmas de promover apoptose em linfócitos (VANDEN BUSH & ROSENBUSCH, 2002).

As mudanças histopatológicas durante as infecções naturais ou experimentais são frequentemente caracterizadas pela moderada ou severa infiltração neutrofílica e de outros mononucleares, sugerindo a estimulação da resposta celular e de mediadores inflamatórios no decurso da infecção (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994). Em inoculação experimental, as mudanças observadas foram hiperemia vulvar, descarga vulvar mucopurulenta e grânulos com aproximadamente 1mm que aparecem em até 48 horas após o aparecimento da hiperemia. Esta granulação surge primeiramente no entorno do clitóris e são de coloração clara e brilhante, posteriormente se torna avermelhada e chega a 2mm de diâmetro (DOIG et al., 1980), e esta manifestação clínica foi denominada de vulvite granular (MULIRA & SAUNDERS, 1994).

Vários fatores patogênicos são descritos para as espécies de micoplasmas. O *M. bovis* parece induzir a produção de fator de necrose tumoral K (TNF-K) e óxido nítrico, os quais são dois potentes mediadores da atividade imunológica em macrófagos de bovinos (VANDEN BUSH & ROSENBUSCH, 2002). Alta concentração de citocinas pró-inflamatórias se torna limitante para a

sobrevivência embrionária (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994). As citocinas são indispensáveis na eficiência da resposta imunológica e em particular na multiplicação e diferenciação de células B para a síntese de anticorpos. As citocinas ativam macrófagos e neutrófilos, e amplificam a atividade antibacteriana de células fagocitárias (CAVAILLON, 1996). A fagocitose é um mecanismo primário envolvido na eliminação de bactérias do trato reprodutivo (AHMADI et al., 2006). Para que a fagocitose seja eficaz é importante que haja mobilização e migração de um número adequado de neutrófilos da circulação periférica em resposta à quimiotaxia produzida de forma direta ou indireta pelas bactérias presentes. O processo inflamatório no trato reprodutivo promove a migração de grande quantidade de neutrófilos para a superfície do órgão (DHALIWAL et al., 2001).

Estudos revelam que as mudanças hormonais durante o ciclo estral influenciam na migração dos neutrófilos para a superfície do órgão. A variação de progesterona e estradiol influenciam no fluxo sanguíneo e conseqüentemente nos mecanismos de defesa (AHMADI et al., 2006). Entre as atividades desenvolvidas pelas citocinas, pode-se citar ainda o recrutamento de células para o local da infecção ativando a adesão de células circulantes às superfícies endoteliais e a diapedese das células circulantes, promovendo a passagem quimiotática transendotelial. Citocinas produzidas durante a infecção promovem a hemopoiese, permitindo assim o aumento do número de células que implicam nos mecanismos de defesa (CAVAILLON, 1996). Trabalhos experimentais demonstraram que ocorre produção de interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF α) e óxido nítrico (NO) por leucócitos quando estimulados pelo *U. diversum* (CHELMONSKA-SOYTA et al., 1994). As estruturas celulares que induzem a síntese destes mediadores inflamatórios pelos micoplasmas são lipoproteínas contendo um glicerídeo-cisteína N-terminal, os quais representam os principais componentes da membrana celular dos micoplasmas. Algumas destas moléculas, como a espiralina, são responsáveis por mais de 20% das proteínas integrais de membrana e apresentam vários antígenos – o p35 e p38 já são descritos, os quais favorecem o escape dos micoplasmas em relação às respostas imunológicas, contribuindo conseqüentemente para a cronicidade das infecções (BRENNER et al., 1997). A maioria dos estudos envolvendo isolamento

e/ou patogenicidade de *Mycoplasma* spp. de trato reprodutivo bovino por infecção natural ou experimental, foi realizada na década de 90 e nenhum deles procurou relacionar o distúrbio encontrado com a presença de outras enfermidades correlatas (NASCIMENTO et al., 2005).

1.4.6. Outros microrganismos

Em vacas recém-paridas, a diminuição da imunidade local, cérvix aberta, presença de restos placentários no útero e o manejo com o animal logo após o parto são as principais causas de complicações e crescimento de microrganismos patogênicos e oportunistas, e entre estes, os mais freqüentes são a *E. coli* (ANDERSON, 2007), outras enterobactérias Gram negativas, *Actinomyces pyogenes*, estreptococos e estafilococos. Entretanto estes microrganismos podem ser encontrados tanto em vacas doentes quanto nas saudáveis (KACZMAROWSKI, 2004). A leptospirose também interfere na saúde reprodutiva, causando principalmente aborto e ocorrendo em bovinos de todo o mundo. É descrito que os sorovares mais importantes são da *Leptospira interrogans hardjo* e *L. pomona*. Os sorovares de *L. interrogans icterohaemorrhagiae* e *grippotyphosa* são raramente associados ao aborto bovino (ANDERSON, 2007).

Estudo realizado no Texas, comparando vacas doentes com as saudáveis, comercializadas para o abate, a fim de identificar microrganismos envolvidos na ocorrência de vaginite detectou que, dentre as bactérias aeróbicas isoladas, as mais freqüentes foram *Acinetobacter lwoffii* (95%), *Arcanobacterium pyogenes* (49%), *Arcanobacterium haemolyticum* (31%), *Bacillus* spp. (20%), *Corynebacterium glucuronolyticum* (29%), *Corynebacterium* spp. (24%), *Escherichia coli* (33%), *Gemella morbillorum* (31%), *Morganella morganii* (35%), *Staphylococcus* spp. (20%), *Stenotrophomonas maltophilia* (11%), *Streptococcus acidominimus* (15%) e *Streptococcus intermedius* (20%) (HUSTED, 2003). A *E. coli* patogênica pode ser considerada agente primário ou secundário ao processo infeccioso. Tanto animais jovens quanto adultos são susceptíveis, e as cepas enteropatogênicas do tipo produtoras de enterotoxinas não invadem os tecidos,

mas sua enterotoxina é absorvida pelas células epiteliais (CARTER, 1986). Em relação às anaeróbicas, as mais freqüentes foram *Peptostreptococcus anaerobius* (13%), *Peptostreptococcus micros* (13%) e *Peptostreptococcus tetrans* (31%). Fungos também foram isolados, dentre os mais freqüentes, citam-se *Aspergillus* spp. (22%), *Mucor* spp. (2%) e *Penicillium* spp. (44%). O autor argumenta que o não isolamento de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* foi um fato inesperado, justificado provavelmente pelo baixo número de microrganismos (HUSTED, 2003).

Bactérias Gram negativas anaeróbicas foram isoladas em lesões de vulvovaginite necrótica de novilhas recém-paridas e de primeira lactação. Dentre os animais testados, 20,69% dos positivos eram vacas de primeira lactação (BLUM et al., 2008). O papel sinérgico de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos em processos infecciosos, especialmente durante o período de involução uterina é apontado como aumento de risco para as endometrites clínicas (SPRINGER et al., 1974). O sinergismo detectado entre as lipoproteínas e os LPS dos micoplasmas, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias sugerem que as lipoproteínas e os LPS ativam os macrófagos em diferentes mecanismos, o mais provável talvez seja resultante da interação entre estas moléculas e os diferentes membros da família de Toll-like receptores (TLR) presentes nas membranas dos macrófagos. As etapas iniciais de interação entre os macrófagos, os LPS e as lipoproteínas são diferentes, mas as vias de tradução dos sinais intracelulares são semelhantes (YOU et al., 2006). Os LPS da *E. coli*, em vacas, foram associados com um aumento transitório de metabólitos de prostaglandina sorológica e diminuição das concentrações de progesterona (DHALIWAL et al., 2001). No caso do *M. bovis*, uma fração polissacarídea foi reportada como sendo citotóxica (ROSSELLI et al., 1998). Por outro lado, verificou-se que a lipoproteína de membrana, espiralina, assim como os lipopolissacarídeos de *E. coli* induzem a blastogênese de células B pelas células T-independentes (BRENNER et al., 1997).

Bactérias Gram negativas são fracamente fagocitadas por macrófagos, a menos que estejam opsonizadas por anticorpos, entretanto, fagocitadas ou não, são rapidamente destruídas. Trabalhos têm demonstrado que a grande maioria dos micoplasmas possuem mecanismos antifagocitários e se apresentam como

micorganismos não invasivos, permanecendo aderidos à superfície das células do hospedeiro, sendo portanto, necessário que as imunoglobulinas produzidas pelo hospedeiro possam intermediar a ação fagocitária dos macrófagos sobre os micoplasmas assim como ocorre com a maioria das bactérias Gram negativas (POWELL & CLYDE, 1975).

A capacidade de identificação destas moléculas pelos TRL cria uma possível explicação para os mecanismos de exacerbação dos processos inflamatórios (CHAMBAUD et al., 1999). É verificado o mesmo tipo de sinergismo estimulando a expressão da óxido nítrico redutase (NOS) e a atuação dos agentes, e a combinação estabelecida entre eles depende do tipo celular e da espécie em questão (MACMICKING et al., 1997). Por outro lado, o efeito inibidor também pode ser notado, como é o caso da *E. coli*, cuja produção de hemolisina inibe a produção de TNF α , IL-1 e IL-6. Da mesma forma, algumas cepas de *E. coli* enteropatogênicas produzem fatores que seletivamente inibem a ativação de células e sua capacidade de produzir ILA-2, ILA-5 e interferon- γ (CAVAILLON, 1996).

1.5. VULVOVAGINITE

Várias são as infecções promovidas pelos micoplasmas, porém especificamente a vulvovaginite já foi descrita por diversos autores (DOIG, et al (1979); AMARAL (2003); BEY (2006); LYSNYANSKY et al. (2009)), como uma inflamação caracterizada por hiperemia, nódulos com 1 a 2 mm de diâmetro, coloração cinza, marrom ou vermelha, os quais podem persistir por vários dias. Os nódulos representam acúmulos de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria da mucosa reprodutiva (NASCIMENTO & SANTOS, 2003). Esta inflamação envolve o aparecimento súbito de descarga vulvar, granulações na mucosa vaginal associada ou não com a presença de vesículas na vulva, as quais tendem a se manifestar de 4 a 10 dias após o serviço, em fêmeas na fase reprodutiva (GAMBARINI et al., 2009).

Os primeiros estudos realizados com animais apresentando evidências da vulvovaginite granular, no Estado de São Paulo, registraram a freqüência de

38,8% (CARDOSO et al., 2000). Em Israel, trabalho de monitoramento acompanhando o desenvolvimento de vulvovaginite em fêmeas no período pós-parto e de primeira lactação mostrou que das 102 vacas de primeira lactação observadas, verificou-se a prevalência de 28,43% e as taxas para as primíparas pós-parto ficaram entre 13,8% e 41,7% para o período observado (BLUM et al., 2008). Porém vários outros autores já descreveram a ocorrência do processo inflamatório em diferentes hospedeiros e por diferentes agentes.

A inflamação, em bovinos, foi relacionada inicialmente com a ocorrência do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) (WENTINK et al., 2000; VAN SCHAİK et al., 2002; DEL FAVA et al., 2003; ANDERSON, 2007). Porém, ao testarem amostras de lesões em vacas repetidoras de estro, outros autores identificaram o *U. diversum* como o agente causal da vulvovaginite (CARDOSO et al., 2000; OLIVEIRA FILHO et al., 2005). HUSTED (2003), no Texas, pesquisou as várias patologias do trato reprodutivo de vacas, especialmente as que afetam o útero e a cérvix e encontrou vários microrganismos envolvidos, entretanto destacou que a vulvovaginite foi relacionada com a presença do *U. diversum*. Trabalhos de monitoramento do rebanho, feitos em Israel, identificaram vulvovaginite em bovinos, causada por *U. diversum*, *M. bovis*, *M. bovigenitalium* e *Caprine herpesvirus* (GIVENS & MARLEY, 2008). Ainda em Israel, testes realizados com vacas de primeira lactação recém paridas, relacionaram a ocorrência da vulvovaginite do tipo necrótica com o *Porphyromonas levii* (BLUM et al., 2008) e na mesma região, vacas com suspeita de infecções por BHV-1, com vários tipos de lesões vulvares e em diferentes estágios reprodutivos, negativas para o *Porphyromonas levii* e para o BHV-1, tiveram como agente causal os *M. bovigenitalium* e *M. canadense* (LYSNYANSKY et al., 2009). Pesquisas realizadas

no Brasil, com fêmeas Nelore em diferentes fases reprodutivas, com grupos não vacinados para o BHV-1, constataram que a vulvovaginite foi promovida pelo *U. diversum* e *Mycoplasma* spp, já que nenhuma das amostras testadas foi positiva para o Herpesvírus Bovino tipo 1 (GAMBARINI et al., 2009). A doença ocorre de forma mais consistente em novilhas virgens (DOIG et al., 1980).

Estudos sobre a ocorrência da vulvovaginite em rebanho brasileiro demonstraram que em 57,15% dos casos o diagnóstico foi positivo para *Mycoplasma* spp (NASCIMENTO et al., 2005), valores estes, superiores aos descritos em outros países (BEY (2006); PETIT et al. (2008)). Dentre os positivos, houve casos em que a vulvovaginite foi caracterizada como discreta, porém com histórico de aborto, reforçando a discussão sobre o envolvimento do *Mycoplasma* spp nas patologias reprodutivas bovinas (NASCIMENTO et al., 2005). A vulvovaginite granular já foi produzida em novilhas livres de doenças através de inoculação experimental de *M. bovis genitalium*, comprovando sua patogenicidade nos distúrbios reprodutivos (NASCIMENTO et al., 2005). Em amostras de campo, a síndrome vulvovaginite promovida por micoplasmas foi descrita mais recentemente, em rebanho de produção de leite da raça Holandesa, em Israel. Nas investigações clínicas e laboratoriais, o *M. bovis genitalium* foi isolado em 11 dos 20 casos clínicos e das amostras de esfregaço vaginal obtido das mesmas vacas, analisados por microscopia eletrônica, três foram positivos para *Mycoplasma canadense*, e em todos eles o *M. bovis genitalium* estava presente (LYSNYANSKY et al., 2009). É descrito que vacas mais jovens (menos de 64 meses) apresentam risco 2,35 vezes maior de se infectarem do que as mais velhas e as primíparas apresentam probabilidade 2,99 vezes maior do que vacas com mais de dois partos, verificando-se também que novilhas mostraram

porcentagens mais altas de infecção (69%) (OLIVEIRA FILHO et al., 2005). Outro fator, talvez o mais evidente, mas que muitas vezes não recebe a devida atenção, é que o animal portador assintomático representa o maior potencial de propagação do microrganismo no rebanho (MERCIER et al., 2007).

1.6. FATORES DE RISCO PARA A MICOPLASMOSE

Os primeiros estudos sobre os riscos de infecções e perdas reprodutivas por influência dos micoplasmas revelaram justamente o sêmen como um importante meio de transmissão (BIELANSKI et al., 2000). Dentre as perdas reprodutivas mais importantes economicamente, destacam-se: Diminuição do número de gestações, ocorrência de perdas fetais ou partos prematuros, perda na qualidade do sêmen e aumento dos custos com veterinários e drogas para tratamento das infecções (CARDOSO & VASCONCELLOS, 2004). Estudando outros fatores de risco para a ocorrência de micoplasmas nos rebanhos verificou-se, na Califórnia, que os grandes rebanhos (> 350 vacas) apresentaram risco relativo 15 vezes maior que rebanhos pequenos (<350 vacas). A razão para isto parece ser a combinação de vários fatores de manejo mal aplicados comumente encontrados em rebanhos maiores. Em contraste, o tamanho do rebanho não foi um fator de risco importante para os estudos realizados em Nova York, não sendo encontradas diferenças significativas para rebanhos compostos por 30 a 400 vacas leiteiras. Dados obtidos no estado de Ohio sugerem que o risco de infecção por micoplasmas também está presente em pequenos rebanhos (GONZALEZ & WILSON, 2003) e na Jordânia os principais riscos foram associados com os animais mais velhos ou em lactação (AL-MOMANI et al., 2008).

A introdução de animais portadores a partir de outros rebanhos também foi considerada como importante fator de risco (NICHOLAS et al., 2006; AL-MOMANI et al., 2008). Ao estudarem a prevalência de micoplasmas no aparelho auditivo de caprinos MERCIER et al. (2007) verificaram que os fatores de risco para a disseminação do agente foram principalmente o trânsito de animais portadores assintomáticos. Estes autores advertem sobre a necessidade de diagnóstico específico, principalmente porque o agente parece se proteger da imunidade do hospedeiro, permanecendo por tempo prolongado no sistema afetado.

Outro fator relacionado à disseminação da micoplasmose é a inseminação artificial. Neste caso, trabalhos com avaliação de sêmen de central de inseminação detectaram que aproximadamente, 40 a 80% das amostras estavam infectadas por microrganismos da Classe *Mollicutes* e as associações entre espécies é freqüente. Comparando a freqüência de isolamento a partir de touros contaminados, foi verificado que a taxa é muito variável: De 6 a 67% (CARDOSO & VASCONCELLOS, 2004). Em relação à disseminação da micoplasmose em rebanho de pequenos ruminantes, AL-MOMANI et al.(2008) relataram que a higiene, quando bem executada, minimiza os riscos de contaminação porém, em propriedades onde há a necessidade da economia de água, a higiene torna-se um fator de risco importante, uma vez que o reaproveitamento de água para determinadas atividades propicia a disseminação da doença. A separação precoce dos bezerros também foi considerado como um importante fator de risco e supõe-se que este fato seja devido ao estresse promovido com o ato da separação em si (AL-MOMANI et al., 2008).

Considerando que os micoplasmas se fixam inicialmente sobre as células mucosas, é descrito que o contato com secreções de lesões ou até mesmo a urina ou as secreções fisiológicas genitais de animais portadores representam importantes fatores de risco para a disseminação do agente (GIVENS & MARLEY, 2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMADI, M.R.; NAZIFI, S.; GHASARI, H.R. Comparison of hormonal changes of estrous cycle with cytology of cervical mucosa and hematological parameters in dairy heifers. *Comparative Clinical Pathology*, London. n.15, p.94–97, 2006.
2. AL-MOMANI, W.; NICHOLAS, R.A.J.; ABO-SHEHADA, M.N. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam. n.83, p.1–10, 2008.
3. ALMEIDA NETO, J.B; SÁ, F.B; BUZINHANI, M; TIMENETSKY, J; MOTA, R.A; ALMEIDA, M.Z. Ocorrência de *Mycoplasma conjunctivae* em ovinos sadios e com ceratoconjuntivite infecciosa, no estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*. São Paulo. v.71, n.1, p.79-81, 2004.
4. AMARAL, W.N. *Soroprevalência de mycoplasma em pacientes com esterilidade feminina*. Instituto De Patologia Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Goiânia. Dissertação [Mestrado]. 2003. 79p.
5. AMARAL, L.A.; ISA, H., DIAS, L.T.; ROSSI JR, O.D.; NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Belo Horizonte. v.24, n.4, p.173-177. 2004.
6. ANDERSON, M.L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*, London. n.68, p.474–486. 2007.
7. ANDRADE, J.R.A.; SILVA, N.; SILVEIRA, W.; TEIXEIRA, M.C.C. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Minas Gerais. n.57, 2005. 6p.
8. BARROS, L.R.; PASCOAL, L.A.F.; SILVA, L.P.G.; BRANDÃO, J.S. Distúrbios de impacto econômico na produção de suínos: Agalaxia. *Revista Electrónica de Veterinaria*, Espanha. v.IX, n.7, 2008. 13p.
9. BEY, I. *Les ureaplasmes en pathologie bovine: Epidemiologie, diagnostic et mesures de controle*. Universite Claude-Bernard. Lyon. França. [THESE]. v.I, n.19, 2006. 90 p.
10. 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*, London. n.53, p.1213-1223. 2000.

11. BIFFA, D.; DEBELA, E.; BEYENE, F. Prevalence and risk factors of mastitis in lactating dairy cows in Southern Ethiopia. *International Journal Applied Research in Veterinary Medicine*, USA. v.3, n.3, 2005.

12. BLOOMSTER, T.G.; LYNN, R.J. Effect of antibiotics on the dynamics of color change in *Ureaplasma urealyticum* cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington. p. 598-600, 1981.

13. BLUM, S.; MAZUZ, M.; BRENNER, J.; FRIEDGUT, O.; KOREN, O.; GOSHEN, T.; ELAD, D. Effects of bovine necrotic vulvovaginitis on productivity in a dairy herd in Israel. *The Veterinary Journal*, London. n.176, p.245–247, 2008.

14. BOLBOACĂ, S.D.; JÄNTSCHI, L. Pearson versus spearman, kendall's tau correlation analysis on structure-activity relationships of biologic active compounds. *Leonardo Journal of Sciences*, Romania. v.5, n.9. p.179-200, 2006.

15. BOSCH, P; WRIGHT JR., R.W. The oviductal sperm reservoir in domestic mammals. *Archivos de Medicina Veterinaria*, Chile. v.37, n.2, 2005.

16. BRENNER, C.; WROBLEWSKI, H.; HENAFF, M.; MONTAGNIER, L.; BLANCHARD, A. Spiralin, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces t-cell-independent b-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. *Infection and Immunity*, Washington. v.65, n.10. p.4322–4329, 1997.

17. BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L.W. Contagem celular somática: Relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural*, Santa Maria. v.35, n.4, p.848-854, 2005.

18. BUZINHANI, M.; BUIM, M.R.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R.C.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J. Genotyping of *Ureaplasma diversum* isolates using pulsed-field electrophoresis. *The Veterinary Journal*, London. Short communication. p.1-3, 2006.

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

20. CAVAILLON, J.M. - Inflammation d'origine bactérienne. *Revue Française D'allergologie Et D'immunologie Clinique*, London. v.36, n.8, p.914-924, 1996.
21. CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L.M.P.S; TEIXEIRA, S.R.; GENOVEZ, M.É. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. *Animal Reproduction Science*, London. v.3-4, n.1, p.137-143, 2000.
22. CARDOSO, M.V.; VASCONCELLOS, S.A. Importância das micoplasmoses na fertilidade de touros - Artigo de revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. v.71, n.2, p.257-265, 2004.
23. CARTER, G. R. *Fundamentos de bacteriologia e micologia*. São Paulo: Roca. p.145 – 147, 1986.
24. CARVALHO, M.P. Tornar-se exportador de leite não é fácil, mas é possível. ANUALPEC – *Anuário da pecuária brasileira*. São Paulo: Instituto FNP. p.189 – 196, 2006.
25. CARVALHO, C.I.C. *Estudo da inibição da aderência de Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC a células epiteliais de pulmão de bovino*. Universidade Técnica de Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa. [DISSERTAÇÃO]. 2008. 82 p.
26. CASTRO, V. *Estudo da soroprevalência da leptospirose bovina em fêmeas em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil*. Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Dissertação [Mestrado]. 2006. 104 p.
27. CERDÁ, R.; XAVIER, J.; SANSALONE, P.; SOTA, R.L.; ROSENBUSH, R. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* a partir de un brote de mastitis bovina en una vaquería de la provincia de Buenos Aires. Primera comunicación en la República Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Argentina. n.42, p.7-11, 2000.
28. CHAMBAUD, I.; WRÓBLEWSKI, H.; BLANCHARD, A. Interactions between *Mycoplasma* lipoproteins and the host immune system. *Trends In Microbiology*, London. [REVIEWS]. v.7, n.12, p.493 – 499, 1999.
29. CHELMONSKA SOYTA, A.; MILLER, R.B; RUHNKE, L.; ROSENDAL, S. Activation of Murine Macrophages and Lymphocytes by *Ureaplasma diversum*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, Canadá. p.275-280. 1994.

30. COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; PAIVA E BRITO, M.A.V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Minas Gerais. v.60, n.2. p.283-288, 2008.
31. COLEMAN, D.A.; THAYNE, W.V.; OAILEY, R.A. Factors Affecting Reproductive Performance of Dairy Cows. *Journal of Animal Science*, California. n.68, p.1793-1803, 1985.
32. CORDEIRO, R. O mito da doença rara. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v.8, n.2, p.111-116, 2005.
33. CORDOVA, M.M. *Desenvolvimento de plasmídeos replicativos artificiais para transformação de Mycolpasma pulmonis, M. capricolum e M. mycoides subsp. mycoides, e dirupção do gene hemolisina A de M. pulmonis por recombinação homóloga*. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Tese [Doutorado]. 2002. p.133.
34. CORREIA, C.; COSTA, E.; PERES, A.; ALVES, M.; POMBO, G.; ESTEVINHO, L. Etiologia das infecções do tracto urinário e sua Susceptibilidade aos Antimicrobianos. *Acta Médica Portuguesa*, Portugal n.20, p.543-549, 2007.
35. CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G. da; PINHEIRO JR, J.W.; SILVA, D.R. da; OLIVEIRA, A.A.; SILVA, K.P.C. da; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. v.73, n.1, p.17-21, 2006.
36. DHALIWAL, G.S.; MURRAY, R.D.; WOLDEHIWET, Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Animal Reproduction Science*, London. n.67, p.135–152, 2001.
37. DEL FAVA, C.; ARCARO, J.R.P.; POZZI, C.R.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E.M.; STEFANO, E. De; OKUDA, L.H.; VASCONCELLOS, S.A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semintensivo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. v.70, n.1, p.25-33, 2003.
38. DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C. Bovine Granular Vulvitis Associated with Ureaplasma Infection *The Canadian Veterinary Journal*. v.20, n.4, 1979.

39. DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C.; Experimental bovine genital ureaplasmosis. I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Canadá. p.8-258, 1980.
40. DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; BOSU, W.T.K. The Genital Mycoplasma and Ureaplasma Flora of Healthy and Diseased Dogs *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Canadá. n.45, p.233-238, 1981.
41. EMANUELSON, U.; OLTENACU, P. A. Incidences and Effects of Diseases on the Performance of Swedish Dairy Herds Stratified by Production. *Journal of Dairy Science*, USA. n.81, p.2376–2382, 1998.
42. FAO - *Food Agriculture Organization*. Food and Agricultural commodities production. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> > Acesso em 12 Nov. 2009.
43. FERNANDES, E.N.; BRESSAN, M.; VERNEQUE, R.S. Zoneamento da pecuária leiteira da região sul do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria.. v.34, n.2, p.485-491, 2004.
44. FERREIRA, G.B.; FERNANDES, H.D. Parâmetros Genéticos para Características Produtivas em Bovinos da Raça Holandesa no Estado de Goiás. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa. v.29, n.2, p.421-426, 2000.
45. FORATTINI, O. P. *Ecologia, Epidemiologia e Sociedade*. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas. 2004. 720p.
46. FOX, L. K; HANCOCK, D. D; MICKELSON, A; BRITTEN, A. Bulk Tank Milk Analysis: Factors Associated with Appearance of *Mycoplasma* sp. in Milk. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, Berlim. n.50, p.235–240, 2003.
47. GÁBOR, G.; TÓTH, F.; ÓSVARI, L.; ABONYI-TÓTH, Zs.; SASSER, R.G. Factors Influencing Pregnancy Rate and Late Embryonic Loss in Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, Moscow. n.43, p.53–58, 2008.
48. 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*, Netherlands. n.41, p.1421–1426, 2009.
49. GDOURA R, KCHAOU W, CHAARI C, ZNAZEN A, KESKES L, REBAI T, HAMMAMI A. *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*

and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infectious Diseases*. v.8, n.7, p.129. 2007.

50. GIVENS, M. D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, London. n.70, p.270–285, 2008.

51. GONZALEZ R.N., WILSON D.J. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, USA. v.19, n.1, p.199-221, 2003.

52. GRÖHN, Y.T.; RAJALA-SCHULTZ, P.J. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, London. p.605–614, 2000.

53. HIMSWORTH, C.G.; HILL, J.E.; HUANG, Y.; WATERS, E.H.; WOBESER, G.A. Destructive Polyarthropathy in Aborted Bovine Fetuses: A Possible Association with *Ureaplasma diversum* Infection? *Veterinary Pathology*, Califórnia. n.46, p.269-272, 2009..

54. HUSTED, J.R. *Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis*. Texas A&M University: Veterinary Microbiology. [Thesis]. 2003. 29p.

55. IBGE – *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=488&z=t&o=1&i=P>> Acessado em: 14 de novembro de 2009.

56. JASPER, D.E.; ROSENDAL,S.; BARNUM, D.A. Acridine orange staining for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cow milk. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington. v.20, n.4, p.5-624, 1984.

57. JORDAN, E.R. Effects of heat stress on reproduction. *Journal of Dairy Science*, USA. n.86, E. Suppl. p.E104 – E114, 2003.

58. JUNQUEIRA, J.R.C., FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.F., ALFIERI, A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. *Ciências Agrárias*, Londrina. v. 27, n.3, p.471-480, 2006.

59. KACZMAROWSKI, M.; MALINOWSKI, E.; MARKIEWICZ, H. Bacteria isolated from the uterus of cows With foetal membrane retained. *Bulletin Veterinary Institute Pulawy* n. 48, p. 33-36, 2004.

60. KIDANEMARIAM, A.; GOUWS, J.; VAN VUUREN, M.; GUMMOW, B.; Ulcerative balanitis and vulvitis of Dorper sheep in South Africa: A study on its aetiology and clinical features. *Journal of the South African Veterinary Association*, África do Sul. v.76, n.4, p.197-203, 2005.
61. 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*, Canadá. n.51, p.440–443, 1987.
62. KRUG, E.E.B. *Estudo para identificação de benchmarking em sistemas de produção de leite no Rio Grande do Sul*. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Faculdade de Administração. Dissertação [Mestrado]. Porto Alegre. 2001. p. 194.
63. KUNDSIN, R.B., PARRENO, A., POULIN, S. Significance of appropriate techniques and media for isolation and identification of *Ureaplasma urealyticum* from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington. v.8, n.4, p.445–453, 1978.
64. LANGFORD, E.V. *Mycoplasma* species recovered from the reproductive tracts of western Canadian cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Canadá. n.39, p.133-138, 1975.
65. LANGFORD, E.V.; RUHNKE, H.L.; ONOVIRAN, O. *Mycoplasma canadense*, a new bovine species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, USA. v.26, n.2, p.212-219, 1976.
66. LEITE, T.E.; MORAES, J.C.F.; PIMENTEL, C.A. Eficiência produtiva e reprodutiva em vacas leiteiras. *Ciência Rural*, Santa Maria. v.31, n.3, p.467-472, 2001.
67. LEÓN, B. A.; CAMPOS, E.; BOLAÑOS, H.; CABALLERO, M. Risk factors for *Ureaplasma diversum* infection in cattle in a tropical environment. *Revista de Biología Tropical*, San José. v.43, n.1-3, p.21-25, 1995.
68. LIERZ, M.; DEPPENMEIER, S.; GRUBER, A.D.; BROKAT, S.; HAFEZ, H.M. Pathogenicity of *Mycoplasma lipofaciens* strain ML64 for turkey embryos. *Avian Pathology*. v.36, n.5, p.389-393, 2007.
69. LOPES, P.F.; REIS, R.P.; YAMAGUCHI, L.C.T. Custos e escala de produção na pecuária leiteira: Estudo nos principais estados produtores do Brasil. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Brasília. v.45, n.3, p.567-590, 2007.

70. LYSNYANSKY, I., BRENNER, J., ALPERT, N., BENJAMIN, A., BERNSTEIN, M., ELAD, D., BLUM, S., FRIEDGUT, O., ROTENBERG, D. Identification of *Mycoplasma bovigenitalium* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. *Veterinary Record*, London. n.165, p.319-322, 2009.
71. MACMICKING, J.; XIE, Q.-w.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, USA. v.15, p.323-350, 1997.
72. MASSUQUETO, S.; ALMEIDA, R.; SEGUI, M.S.; COELI, C.R.V.R.; PEREIRA, I.R.; GREBORI, A. Acompanhamento médico veterinário de vacas leiteiras de elevada produção, das raças holandesa preta e branca, vermelha e branca e pardo-suíça, recém-paridas. *Revista Acadêmica*, Curitiba. v.5, n.3, p.243-248, 2007.
73. MERCIER, P.; PELLET, M.P.; MORIGNAT, E.; CALAVAS, D.; POUMARAT, F. Prevalence of mycoplasmas in external ear canal of goats: Influence of the sanitary status of the herd. *Small Ruminant Research*, USA. n.73, p.296–299, 2007.
74. MESEGUER, M.A.; ÁLVAREZ, A.; REJAS, M.T.; SÁNCHEZ, C.; PÉREZ-DÍAZ, J.C.; BAQUERO, F. *Mycoplasma pneumoniae*: A reduced-genome intracellular bacterial pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, USA. n.3, p.47–55, 2003.
75. MOBERG, GARY P. Effects of Environment and Management Stress on Reproduction in the Dairy Cow. *Journal of Dairy Science*, USA. v.59, n.9, p.1618-1624, 1975.
76. MONTEIRO NOVO, A.L, SCHIFFLER, E. A. *Princípios básicos para a produção econômica de leite*. Documentos 49. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 2006. 33p.
77. MONTAGNER, C.; CRUZ, C. F.; ALBINI, C.A; HÖRNER, R.; BERNARDI, P. Prevalência de casos de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* nas secreções endocervicais e urinas de primeiro jato em um laboratório de análises clínicas de Brusque-SC. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro. v.39, n.2, p.83-88, 2007.
78. MOSS, N.; LEAN, I.J.; REID, S.W.J.; HODGSON, D.R. Risk factors for repeat-breeder syndrome in New South Wales dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam. n.54, p.91–103, 2002.

79. MULIRA, G.L. SAUNDERS, J.R. Humoral and secretory antibodies to *Ureaplasma diversum* in heifers following subcutaneous vaccination and vaginal infection, *Canadian Journal of Veterinary Research*, Canadá. v.58, p.104–108, 1994.
80. NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. 2ª ed. p. 70 – 89, 2003.
81. 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*, Rio Grande do Sul. n.33, p.195-199. April 2005.
82. NICHOLAS, R.A.J.; AYLING, R.D. *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, USA. n.74, p.105–112, 2003.
83. NICHOLAS, R.A.J., AYLING, R.D., WOODGER, N., WESSELLS, M. E. and HOULIHAN, M.G. Mycoplasmas in adult cattle: Bugs worth bothering about? *Irish Veterinary Journal*. v.59, n.10, 2006.
84. NUNES, M.J.; CAMÕES, M.F. Comparação de duas metodologias de amostragem atmosférica com ferramenta estatística não paramétrica. *Química Nova*, São Paulo. v.28, n.2, p.179-182, 2005.
85. 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.
86. OLIVEIRA, M.C.S. *Doenças infecciosas em sistemas de produção de leite*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 2006. 34p.
87. PEREIRA, M.G. *Epidemiologia – teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. 8ª ed. 2005. 596p.
88. PETIT, T; SPERGSE, J; AURICH, J; ROSENGARTEN, R. Prevalence of *Chlamydiaceae* and *Mollicutes* on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, USA. v.127, n.3-4, p.325-333, 2008.
89. PETIT, T; SPERGSE, J; AURICH, J; ROSENGARTEN, R. Examination of semen from bulls at five Austrian artificial insemination centres for chlamydiae and mollicutes. *Veterinary Record*, London. n.162, p.792 – 793, 2008 (a).

90. POVEDA, J.B. Biochemical characteristics in *Mycoplasma* identification in *Mycoplasma* protocols: Methods in molecular biology. Edited by ILES, Rogerm and NICHOLAS, Robinn. Humana Press: New Jersey. cap. 9. v.104, p.69 – 78, 1998.
91. POWELL, D.A.; CLYDE Jr., W.A. Opsonin-reversible resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to in vitro phagocytosis by alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, Washington. v.11, n.3, p.540-550, 1975.
92. PRESTES, D.S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: Fatores que a influenciam – uma revisão. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia Uruguaiana*. v.9, n.1, p.48-59, 2002.
93. PRETTO, L.G.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Belo Horizonte. v. 21, n.4, p.143-145, 2001.
94. RAJALA-SCHULTZ, P, J; GROHN, Y T. Culling of dairy cows. Part II. Effects of diseases and reproductive performance on culling in Finnish Ayrshire cows. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam. v.41, n.4, p.279-94, 1999.
95. RIBEIRO, M.G.; JULIANA, S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Belo Horizonte. v.29, n.1, p.52-58, 2009.
96. ROSSELLI, M., KELLER, P.J.; DUBEJ, R.K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction*, Inglaterra. n.4, p.3–24, 1998.
97. ROSSING, W.; HOGWERF, P.H. State of the art of automatic milking systems. *Computers and Electronics in Agriculture, USA*. n.17, p.1-17, 1997.
98. ROTTEM, S. Interaction of *Mycoplasmas* with host cells. *Physiological Reviews*, USA. n.83, p.417–432, 2003.
99. 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*, Canadá. v.42, p.151-155, 1978.

100. RUMEL, Davi. "Odds ratio": Algumas considerações. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo. n.20, p.253 – 248, 1986.
101. SAMPAIO, R.F.; MANCINI, M.C. Estudos de revisão sistemática: Um guia para síntese criteriosa da evidência científica. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, São Carlos, v.11, n.1, p.83-89, 2007.
102. SANDERSON, M.W.; CHENOWETH, A.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*, London. n.54. p.401-408, 2000.
103. SANTOS, L.G.C.; FERNANDES, E. A.N.; BACCHI, M.A.; SARRIÉS, G.A.; BLUMER, L.; BARBOSA JÚNIOR, F. Chemical composition of bovine milk from Minas Gerais State, Brazil. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. n.282, p.493–496, 2009.
104. SARGEANT, J.M.; SHOUKRI, M.M.; MARTIN, S.W.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K.D. Investigating potential risk factors for seasonal variation: An example using graphical and spectral analysis methods based on the production of milk components in dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam. n.36, p.167-178, 1998.
105. SILVA, A.S.A.; ROMERO, É.A. Gerenciamento de Custos da Pecuária de Leite em Propriedade Rural Situada em Roncador – Pr. *Revista em Agronegócios e Meio Ambiente*, Campo Mourão. v.2, n.1, p.69-85, 2009.
106. 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*, Canadá. v.58, n.2, p.114–121, 1994.
107. SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; MOREIRA, E.C.; BRITO, M.A.V.P.; BASTOS, R.R. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Minas Gerais. v.57, n.2, p.251-260, 2005.
108. SPERGSER, J.; AURICH, C.; AURICH, J.E.; ROSENGARTEN, R. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Veterinary Microbiology*, USA. v.87, p.119–129, 2002.
- 109.

110. SPRINGER, W. T.; LUSKUS, C.; POURCIAU, S.S. Infectious bronchitis and mixed infections of *Mycoplasma synoviae* and *Escherichia coli* in gnotobiotic chickens - synergistic role in the airsacculitis syndrome. *Infection and Immunity*, Washington. v.10, n.3, p.578-589, 1974.
111. TAYLOR-ROBINSON D, BARILE M.F; FURR P.M; GRAHAM C.E. Ureaplasmas and mycoplasmas in chimpanzees of various breeding capacities. *Journal of Reproduction and Fertility*, USA. v.81, n.1, p.169-73. 1987.
112. THIBIER, M. Identified and unidentified challenges for reproductive biotechnologies regarding infectious diseases in animal and public health. *Theriogenology*, London. n.56, p.1465-1461, 2001.
113. TILLARD, E.; HUMBLLOT, P.; FAYE, B.; LECOMTE, P.; DOHOO, I.; BOCQUIER, F. Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and sub-tropical conditions. *Theriogenology*, London. n.69, p.443–457, 2008.
114. VANDEN BUSH, T.J.; ROSENBUSCH, R.F. *Mycoplasma bovis* induces apoptosis of bovine lymphocytes. Federation of European Microbiological Societies: *Immunology and Medical Microbiology*. n.32, p.97 - 103, 2002.
115. VAN SCHAIK, G.; SCHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A.A.; BARKEMA, H.W.; BENEDICTUS, G. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: A cohort study. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam. n.54, p.279–289, 2002.
116. VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBE`S, C.; MONTEL, M.C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology*. n.26, p.305–310, 2009.
117. VIANNA, F.P.; CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E. ; CAMPOS, F. R. ; TEIXEIRA, S. R. ; MIYASHIRO, S. . Relato de infertilidade de touros da raça nelore relacionada à presença de *Ureaplasma diversum* e *Histophilus somni*. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.71, p.1-749, 2004.
118. WENTINK, G.H.; FRANKENA, K.; BOSCH,J.C.; VANDEHOEK, J.E.D.; VAN DEN BERG,T.H. Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Livestock Production Science*, USA. n.62, p.207–220, 2000.
119. WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. *Journal of Animal Science*, California. n.65, p.495-501, 1982.

120. YOU, X.X.; ZENG, Y.H.; W, U. Y. Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, Shanghai. v.7, n.5, p.342-350, 2006.

CAPITULO II

FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM FEMEAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO.

RESUMO

Com o objetivo de identificar fatores de risco para a ocorrência de *U. diversum*, em diferentes sistemas de produção de leite (SPL), um estudo transversal foi desenvolvido envolvendo nove sistemas de produção de leite a pasto, localizados nas mesorregiões central e sul do Estado de Goiás. Durante as visitas aplicava-se um questionário, no qual eram anotadas as condições ambientais, características de manejo dos animais, perfil produtivo e as características clínicas das fêmeas avaliadas. De cada animal foram obtidas duas amostras de muco vulvovaginal, sendo uma para isolamento e identificação de bactérias ambientais e patogênicas, utilizando-se procedimentos de rotina, e outra para isolamento de *Mycoplasma spp* e *U. diversum*. Para análise estatística utilizou-se o software livre Epi Info versão 3.5.1, definindo-se como variável dependente a presença ou ausência de *U. diversum*. Dos nove SPL visitados, seis utilizavam ordenha mecânica e três manual. Das 506 fêmeas amostradas, 73,5% estavam em lactação, 46,6% prenhes, 1,8% apresentaram lesão de VVG grave, 98,2% lesão de VVG leve a moderada, 44,7% foram positivas para *Mollicutes*, sendo 32,6% para *U. diversum*, e 9,9% foram positivas para *E. coli*. Nos SPL 2 e 3 verificou-se as maiores freqüências para o *U. diversum*, e os menores valores de Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS). Nos SPL 8 e 9 verificou-se elevada freqüência de isolamentos positivos para *U. diversum*, *E. coli* e CBT. Nos SPL 9 e 5 verificou-se alta freqüência de positividade para *E. coli* e altos valores de CCS e CBT. Houve associação significativa ($P < 0.05$) entre CBT \geq a 20.000 ufc/mL ($\chi^2 = 5,93$) e isolamentos positivos para *U. diversum*, sendo esta característica considerada como fator de risco para a ocorrência do *U. diversum*, entretanto não foi significativa ($P > 0.05$) para a CCS, ($\chi^2 = 0,005$), ou seja, CCS \geq 300.000 cel/mL não indicaram fator de risco para o agente. A freqüência de animais portadores do *U. diversum*, esteve mais elevada nos maiores rebanhos, foi maior para aqueles ordenhados pelo sistema mecanizado em fila indiana, os quais apresentaram 52,8% de positividade, enquanto que os animais submetidos à ordenha manual, obtiveram 45,3% de freqüência para o *U. diversum*. Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que foi possível identificar, dentre os fatores estudados, quais representam potenciais fatores de risco para isolamentos positivos de *U. diversum* no rebanho, sendo eles: lesões de VVG grave; vacas ordenhadas manualmente; vacas ordenhadas mecanicamente em fila indiana; presença concomitante de *E. coli* em amostras de muco vulvovaginal.

Palavras-chaves: Lactação, bovino, *Ureaplasma diversum*, vulvovaginite.

ABSTRACT

In order to identify risk factors for the occurrence of *Ureaplasma diversum* in different systems of milk production (SPL), a cross-sectional study was conducted involving nine systems of milk production on pasture, located in central and south-regions of the State of Goiás applied a questionnaire in which were recorded environmental conditions, characteristics of management of animal production profile and clinical characteristics of females evaluated. From each animal were obtained from two samples of vulvovaginitis mucus, one for isolation and identification of environmental and pathogenic bacteria, using routine procedures, and one for isolation of *Mycoplasma* spp and *U. diversum*. Statistical analysis used the free software Epi Info version 3.5.1, defining the dependent variable was presence or absence of *U. diversum*. Of the nine SPL visited, six used three milking and manual. Of the 506 females surveyed, 73.5% were lactating, pregnant 46.6%, 1.8% had severe injury VVG, 98.2% injury VVG mild to moderate, 44.7% were positive for *Mollicutes*, and 32.6% for *U. diversum*, and 9.9% were positive for *E. coli*. In the SPL Indicator 2 and 3 shows that the highest frequencies for the *U. diversum*, and lower values of Total Bacterial Count (CBT) and Somatic Cell Count (SCC). In SPL 8 and 9 It was a high frequency of positive isolates for *U. diversum*, *E. coli* and CBT. In the SPL 9 and 5 verified a high frequency of positive results for *E. coli* and high values of CCS and CBT. Significant association ($P < 0.05$) between $CBT \geq 20,000$ cfu / mL ($\chi^2 = 5.93$) and isolates positive for *U. diversum*; this is considered as a risk factor for the occurrence of *U. diversum*, however was not significant ($P > 0.05$) for SCC, ($\chi^2 = 0.005$), ie, $SCC \geq 300,000$ cells / mL did not indicate a risk factor for the agent. The frequency of animals carrying the *U. diversum*, was higher in larger herds, was higher for those milked by the mechanized system in single file, which showed 52.8% positivity, whereas the animals subjected to milking, obtained 45.3% of frequency for the *U. diversum*. The results of this study showed that it was possible to identify, among the factors studied, which represent potential risk factors for positive isolates of *U. diversum* the herd, namely: VVG serious injuries, hand milked, cows milked mechanically in single file; concomitant presence of *E. coli* in samples of vulvovaginitis mucus.

Key-words: Lactating, bovine, vulvovaginitis, *Ureaplasma diversum*.

CAPITULO II

FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO POR *Ureaplasma diversum* EM FÊMEAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO.

1. INTRODUÇÃO

As patologias do sistema reprodutivo tais como vaginite, cervicite e infecções uterinas são apontadas como as principais causas de morte embrionária precoce, aborto ou parto prematuro em bovinos. A identificação destas patologias, bem como do agente causal são pré-requisitos, quando possível, para a intervenção medicamentosa aos afetados e de medidas preventivas em relação aos não afetados (HUSTED, 2003). O diagnóstico precoce dos agentes é fundamental para minimizar os índices negativos nos rebanhos e para isso é necessário viabilizar técnicas mais eficientes para o diagnóstico de distúrbios reprodutivos e identificar os fatores de risco envolvidos na transmissão e manutenção dos agentes responsáveis (BUZINHANI et al., 2007). Para controlar as infecções é importante considerar a fonte e os métodos de transmissão de cada doença. Os organismos envolvidos nos processos patogênicos dos animais de uma propriedade leiteira estão distribuídos em ambientes diferentes. Fezes, material da cama, pele, equipamentos utilizados na ordenha e os materiais utilizados em cocheiras ou currais são locais próprios para o alojamento destes microrganismos. A limpeza da vaca e das instalações, assim como boas práticas de manejo, especialmente na ordenha, são métodos eficazes para controlar a disseminação destes agentes (ENRIQUEZ et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009).

A identificação do agente ou dos fatores de risco relacionados também é importante porque permite a tomada de decisões e estratégias para evitar que os animais contraiam a doença ou minimizar seus efeitos, principalmente quando se conhece que os agentes promotores de distúrbios reprodutivos são normalmente transmitidos por contato com as secreções de animais doentes, fômites ou até mesmo pelo ar, cujos focos não são facilmente controláveis (GIVENS & MARLEY, 2008). Entre os microorganismos relacionados com os distúrbios reprodutivos é reconhecida a importância dos micoplasmas. Avaliar a presença destas bactérias na unidade produtora de leite é importante

principalmente porque estes agentes apresentam a característica epidemiológica de aparecerem inicialmente em alto potencial de propagação, atingindo animais de todas as categorias e posteriormente esta taxa de transmissão é reduzida ao ponto do microrganismo praticamente desaparecer do órgão afetado (FOX et al., 2003)

A ocorrência da síndrome vulvovaginite granular (VVG), ou vulvite granular tem sido associada com marcante queda nos índices produtivos, principalmente aquelas relacionadas ao insucesso ao primeiro serviço (CARDOSO & VASCONCELOS, 2004). Alguns microrganismos têm sido mais comumente isolados das secreções presentes nas mucosas vaginal e vulvar de vacas com VVG, tais como *Porphyromonas levii* (ELAD et al., 2004), Herpesvirus bovino Tipo 1 (HBV-1) (NANDI et al., 2009), *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) (KWIECIEN & LITTLE, 1991), e *Mollicutes*, dentre eles *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* (GAMBARINI et al. 2009).

A presença do *U. diversum* em fêmeas de produção pode ser percebida pelas lesões de VVG, principalmente em animais negativos para o herpesvirus bovino (HBV-1) (GAMBARINI et al., 2009), porém o agente pode ocorrer também em animais sem lesões, sendo este um importante fator relacionado com a disseminação do *U. diversum* entre os animais de produção. O *U. diversum* é considerado um patógeno oportunista do trato genital dos bovinos e está relacionado com surtos de VVG, aborto e infertilidade tanto em fêmeas quanto machos (CHELMONSKA-SOYTA et al. 2001). Para determinar sua participação na ocorrência do aborto, deve-se proceder o isolamento do *U. diversum* de amostras fetais como os pulmões ou membranas fetais (ANDERSON, 2007). A fixação do micoplasma sobre as membranas mucosas é facilitado pela característica lipopolissacarídica de sua membrana a qual apresenta a lipoproteína de membrana, espiralina que, semelhante aos lipopolissacarídeos de *E. coli*, induzem a blastogênese de células B pelas células T-independentes e ainda favorecem os mecanismos anti-fagocitários (BRENNER et al., 1997). As lesões no epitélio vulvar ocorrem em aproximadamente 10% dos animais infectados. A morbidade é de 37%, podendo chegar a 75% em confinamentos e quando chega a proporções elevadas a fertilidade é prontamente

comprometida, resultando na queda da taxa de concepção para 20% ou até 13% nas formas crônicas da infecção (DOIG et al., 1979).

O *U. diversum* apresenta grande variedade antigênica na estrutura celular, as quais expressam variados graus de patogênese para o hospedeiro infectado (Le GRAND et al., 1995). É sugerido que a infecção tende a permanecer por tempo mais prolongado, mesmo em animais assintomáticos, devido a presença de uréia nas secreções do trato urogenital, importante nutriente para a sobrevivência desta bactéria (SANDERSON et al., 2000).

O *U. diversum* pode ser introduzido no rebanho durante a estação de monta ou por sêmen contaminado (PETIT et al., 2008a). As perdas reprodutivas resultantes estão relacionadas principalmente com sua capacidade de interferir no metabolismo das prostaglandinas que são importantes mediadores do processo de implantação embrionária e de manutenção da prenhez (AMARAL, 2004). Aborto no último trimestre da gestação, retenção de envoltórios fetais, placentite com opacidade multifocal e extensas área hemorrágicas no âmnion, assim como alterações corioalantoidianas, necrose e infiltrado de mononucleados no estroma corioalantoidiano, lesões pulmonares com alveolite não supurativa e conjuntivite erosiva em fetos abortados, têm sido alguns dos principais processos patológicos indicativos da ocorrência de infecções por *U. diversum* resultando em perdas reprodutivas (ANDERSON, 2007). Casos de mortalidade neonatal demonstraram também a *Salmonella* spp como importante agente etiológico, porém de baixa frequência (MORRELL et al., 2008). Outros agentes bacterianos envolvidos em histórico de perdas reprodutivas são *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus*, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia marcescens*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., sendo entretanto consideradas oportunistas e de ocorrência esporádica (ANDERSON, 2007). A presença de *Mollicutes* nos processos infecciosos pode ocorrer isoladamente ou associada a outros microrganismos que participam de forma sinérgica na severidade dos processos patológicos (SPRINGER et al., 1974; MAUNSELL & DONOVAN, 2009). PETIT et al. (2009), avaliando as bactérias mais comumente isoladas de muco cervical e vaginal de vacas com problemas reprodutivos, a maior parte com endometrite clínica ou saudáveis, verificaram isolamentos

positivos para *Escherichia coli* (hemolítica e não hemolítica) nos dois casos, com maior número de amostras vaginais positivas.

A VVG é uma das patologias do sistema reprodutor favorecida pela alta densidade, uma vez que o agente presente nas secreções nasais ou vaginais se propaga de forma horizontal, facilmente pelo contato. Esta patologia foi caracterizada como um processo inflamatório com lesões inicialmente pequenas e claras, as quais, em até dois dias após a infecção, tornam-se maiores; a secreção vulvovaginal inicialmente é mucopurulenta, tornando-se semelhante ao muco liberado durante o estro (DOIG et al., 1980; OLIVEIRA FILHO et al., 2005). Os *Mollicutes* envolvidos na VVG são disseminados também pelo coito ou sêmen contaminado (SPERGSEER et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2005), fômites, durante a ordenha de vacas infectadas e não infectadas, pelos equipamentos de ordenha tocando tetos mal higienizados, as mãos do ordenhador ou a falta de higiene nos procedimentos terapêuticos (MAUNSELL & DONOVAN, 2009). Considerando que a presença de *Mollicutes* já foi detectada em amostras de leite obtidas de tanques de unidades produtoras (FOX et al., 2003), há maior preocupação em conhecer o potencial epidemiológico e as chances de risco atribuídas à ocorrência destes agentes, especialmente do *U. diversum*.

A Instrução Normativa nº 51 traz critérios que auxiliam no Programa de Qualidade do Leite, no que se refere aos limites máximos para a contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), determina o resfriamento obrigatório do leite na fazenda e estabelece limites máximos para resíduos de antibióticos no leite. Também traz instruções para a infra-estrutura adequada para que o sistema de ordenha tenha maior qualidade higiênica e sanitária na obtenção do leite para a industrialização (BRASIL, 2002). No Brasil, a DPA (*Dairy Partners Américas*) - uma das duas grandes empresas na cadeia láctea: Nestlé e Fonterra valorizam o leite enviado para indústria com base em vários critérios, entre eles os valores mínimos de CCS e CBT (DPA, 2009). A relação entre as práticas de ordenha e a diversidade de microrganismos que podem ser detectados como promotores de distúrbios reprodutivos nas fêmeas de produção, associa-se com aspectos higiênicos e de manejo durante o processo. A contagem de células somáticas (CCS) tem sido considerada medida padrão de qualidade do leite e possui alta relevância para a unidade produtora, pois indica o

estado sanitário das vacas de produção (BUENO et al., 2005) e os parâmetros obtidos com a CCS são indicativos da sanidade animal, assim como a CBT é indicativo da higiene de ordenha (OLIVAL et al., 2004). O conhecimento dos parâmetros relacionados ao nível de higiene do animal e do sistema de ordenha e os critérios ambientais globais como o controle dos equipamentos de ordenha, a infra-estrutura dos galpões e a convivência entre animais sadios e portadores contribuem de forma satisfatória para o controle de patógenos transmissíveis entre os animais de produção (VERDIER-METZ, 2009).

Neste sentido, este experimento foi desenvolvido com o objetivo de identificar fatores de risco para a ocorrência de *Ureaplasma diversum*, em diferentes sistemas de produção de leite.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO

Foram visitados nove sistemas de produção de leite a pasto, localizados na mesorregião central e sul do Estado de Goiás, Latitude entre $-16^{\circ} 01' 13''$ e $17^{\circ} 47' 53''$, Longitude $49^{\circ} 18' 40''$ e $50^{\circ} 55' 41''$, com altitude entre 716 e 948 metros acima do nível do mar. As visitas e colheitas ocorreram nos meses de maio e setembro de 2008, quando a temperatura média mensal foi de 23°C em maio e de 25 a 27°C em setembro. A pluviosidade foi de 25 a 50mm em maio e de 50 a 100mm em setembro.

Durante as visitas aplicava-se um questionário, no qual eram anotadas as condições ambientais, características de manejo dos animais, perfil produtivo e as características clínicas das fêmeas avaliadas. Os dados produtivos de cada rebanho, assim como os valores de CBT e CCS, foram obtidos dos registros mantidos pelo Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira (PDPL) ou pela Cooperativa Agroindustrial dos Produtores Rurais do Sudoeste Goiano (COMIGO).

A seleção das propriedades foi feita por Amostragem Não-Probabilística por Conveniência (SILVA & MENEZES, 2001), isto é, os sistemas estavam localizados nas principais regiões produtoras de leite para a industrialização, eram assistidas por Médico Veterinário ou pelas cooperativas, dispunham de fácil acesso, procediam duas ordenhas diárias e as visitas eram feitas em concordância com os proprietários. Quanto ao manejo reprodutivo, o inseminador era orientado pelo médico veterinário do PDPL ou da COMIGO, que era responsável pela orientação técnica e manejo sanitário e reprodutivo dos rebanhos. Os protocolos de sincronização de estro/ovulação não eram rotineiramente utilizados. Além destas observações, durante a visita e colheita de material eram verificados também, conforme Anexo 1:

- Produtividade em litros de leite por dia, por vaca;
- sistema de ordenha;
- tipo de ordenha;
- cobertura dos galpões de ordenha;
- piso dos galpões de ordenha;

- higiene dos galpões de ordenha;
- localização da esterqueira.

2.2. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE MATERIAL

A obtenção das amostras foi feita pela amostragem por conveniência, de acordo com a rotina da visita do médico veterinário pelo sistema de produção. De cada animal foram obtidas duas amostras de muco vulvovaginal para microbiologia, e as colheitas eram feitas durante a ordenha nas vacas em lactação, ou durante o exame de rotina feito pelo médico veterinário. Inicialmente verificava-se a presença ou não de lesões típicas de vulvovaginite granular (VVG), as quais eram classificadas em dois graus - leve a moderado e severo, de acordo com a quantidade e extensão na distribuição de vesículas, assim como presença ou não de hiperemia, adaptando-se a metodologia descrita por GAMBARINI et al. (2009).

O procedimento seguinte consistia da colheita de muco vulvovaginal, utilizando-se duas zaragoas estéreis, de acordo com CERDÁ et al. (2000). As amostras foram depositadas em meio de transporte A_{3xB} e Caldo Tioglicolato, separadamente. O caldo Tioglicolato foi levado até o Laboratório de Microbiologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da UFG e o meio de transporte A_{3xB} ao Setor de Reprodução Animal da UFG para processamento.

Todas as amostras foram processadas em período não superior a 24 horas. Para a bacteriologia geral as amostras em Caldo Tioglicolato foram semeadas nos ágar Sangue e MacConkey e incubadas em condições de aerobiose em estufa bacteriológica, a 37⁰ C. Após o período de incubação efetuava-se a avaliação morfológica e tintorial das colônias, assim como as provas bioquímicas específicas para identificação, segundo OLIVEIRA (1995).

Para o isolamento de *Mollicutes* aliquotas do meio de transporte A_{3xB} contendo muco vulvovaginal eram inoculadas em Caldo Ub, Agar Ub e Agar Hayflick. Os caldos eram incubados em estufa bacteriológica a 37⁰ C, sob condições de aerobiose, com os tubos tampados, e as placas dos ágar eram incubadas sob condições de microaerofilia, em jarras de anaerobiose com vela acesa, em estufa a 37⁰ C conforme procedimento recomendado por CARDOSO et al. (2000). Os caldos eram observados diariamente por período de até sete dias,

para verificação da atividade da urease pela alteração da cor do meio líquido (aumento do pH), e as placas incubadas por até 15 dias, e submetidas à primeira avaliação 48 horas após a inoculação, e posteriormente, a uma avaliação diária, em microscópio estereoscópico, para visualização de colônias em forma de “ovo frito”, características dos micoplasmas, confirmando-se pela coloração de Dienes (*Mycoplasma* spp) e pela presença de pequenas colônias granulosas de coloração marrom escura (*Ureaplasma diversum*). As culturas consideradas negativas foram aquelas nas quais não foi possível observar alterações do pH do caldo e/ou aquelas nas quais não foram evidenciadas colônias características no ágar.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística utilizou-se o princípio do estudo transversal (PETRIE & WATSON, 2009), definindo-se como variável dependente a presença ou ausência de *Ureaplasma diversum*. Como variáveis independentes relacionadas ao animal considerou-se os graus de lesão de VVG, isolamentos positivos para *Escherichia coli* no muco, condição produtiva - seca ou em lactação e condição reprodutiva - vazia ou prenhe. Como variáveis independentes relacionadas ao sistema de produção considerou-se a produção de leite/vaca/dia, o sistema de ordenha - manual ou mecânica, o tipo de ordenha mecânica - balde ao pé, espinha de peixe ou fila indiana, características da sala/galpão de ordenha, forma de higienização do local e ordenha -vassoura, água ou sanitizante, destino dos excrementos - distância inferior ou superior a 50 m, contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite cru.

Todas as variáveis foram classificadas em “ausência” ou “presença”, e os dados tabulados em planilhas eletrônicas. A regressão logística foi utilizada para analisar se fatores de risco potenciais (variáveis independentes) estavam significativamente associadas com o isolamento positivo para *Ureaplasma diversum*. O grau de associação entre os fatores de risco potenciais e a frequência de isolamentos foi estudado por meio do *odds ratio*, segundo CORDEIRO (2005). Para as análises utilizou-se o software livre Epi Info versão 3.5.1.

3. RESULTADOS

Foram visitados nove sistemas de produção de leite (SPL) localizados nas mesorregiões central e sul do Estado de Goiás. Todos os sistemas de produção eram do tipo extensivo, com os animais mantidos a pasto, suplementação com concentrado no período chuvoso e concentrado e silagem no período seco. O padrão racial foi de animais *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*, com diferentes graus de sangue. Quanto ao manejo reprodutivo, houve predomínio da inseminação artificial, e média de um bezerro/vaca/ano. Os sistemas de ordenha utilizados eram o manual ou a mecanizada. Os sistemas de ordenha mecânica eram com balde ao pé, com animais posicionados lado-a-lado, ou o contínuo, onde os animais eram posicionados em fila indiana ou em espinha de peixe. A TABELA 1 traz os dados relativos aos sistemas de produção visitados.

TABELA 1. Dados obtidos nas nove propriedades visitadas com o número de vacas por rebanho, número de colheitas, a produção diária de leite, o sistema e o tipo de ordenha, a infra-estrutura dos galpões e o controle de qualidade do leite.

Sistema de produção	Produção de leite			Salas de ordenha					Controle de qualidade		
	Total de vacas	Vacas colhidas	Prod. L/dia	Sistema de ordenha	Tipo de ordenha	Telha	Piso	Higiene	Esterqueira	CCS cel/ mL x10 ³	CBT ufc/ mL x10 ³
1	44	12	17,2	MC 6x2	Esp. peixe	AM	CM	SAN	<50m	435,3	9,6
2	115	108	23,0	MC 6x2	Fila india.	Barro	CM	Água	<50m	NI	NI
3	116	47	17,0	Manual	-	AM	CM	Água	<50m	NI	NI
4	41	38	12,0	MC 4x2	Bal. pé	AM	Barro	VAS & Cal	<50m	332,0	5,0
5	67	46	12,4	MC 4x2	Bal. pé	AM	CM	Água	<50m	109,0	32,0
6	70	33	10,0	Manual	-	AM	CM	VAS	<50m	152,0	20,0
7	54	26	8,0	Manual	-	Metal	CM	VAS	<50m	193,0	21,0
8	180	98	20,0	MC 6x2	Esp. peixe	AM	CM	VAS	<50m	160,0	37,0
9	180	98	14,0	MC 6x2	Esp. peixe	AM	CM	SAN	>60m	875,0	39,5
Total	867	506	14,8±4.8	-	-	-	-	-	-		

(MC) ordenha mecânica; (AM) amianto; (CM) cimento; (SAN) sanitizantes; (VAS) vassoura; (NI) não informado.

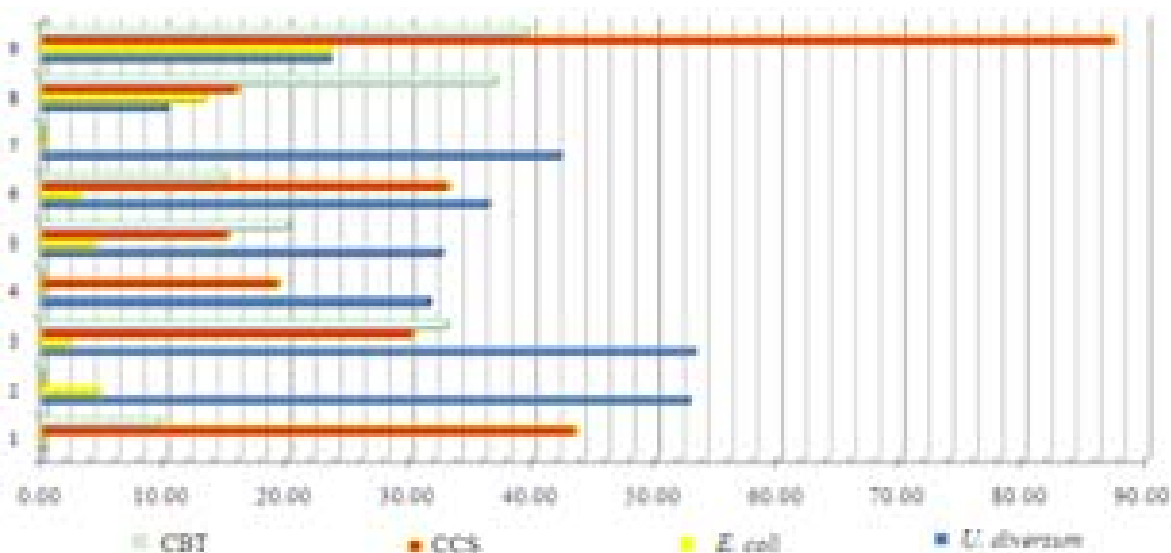
O número de animais amostrados em cada SPL variou de 27,3% a 92,7% do total do rebanho, resultando em 506 amostras obtidas.

Dos nove SPL visitados, seis utilizavam ordenha mecânica e três manual. Dos sistemas de ordenha mecânica, três eram em espinha de peixe com lotação de 12 animais por vez, um do tipo fila indiana, também com 12 animais na sala de ordenha e dois do tipo balde ao pé, com lotes de oito animais mantidos lado a lado e ordenhados.

Em relação à infra-estrutura, sete dos nove galpões eram cobertos por telhas de amianto, um por telha de barro e um por telha de metal. Oito do total de galpões tinham piso de cimento e um deles apresentava piso de terra. Para a higiene dos galpões, dois deles eram lavados com água e sanitizantes, três com jatos de água, um era limpo utilizando vassoura e eventualmente cobertura de cal, os outros três eram limpos apenas com vassoura. Os excrementos eram lançados nas esterqueiras, as quais estavam, em oito propriedades, localizadas a menos de 50 metros de distância do galpão de ordenha, uma estava a mais de 60 metros do galpão e todas eram mantidas sem nenhum tipo de cobertura ou tratamento, permitindo a passagem dos animais sobre elas durante a condução para a ordenha.

Das 506 fêmeas amostradas, 73,5% estavam em lactação, 46,6% prenhes, 1,8% apresentaram lesão de VVG grave, 98,2% lesão de VVG leve a moderada, 44,7% foram positivas para *Mollicutes*, sendo 32,6% para *U.*

FIGURA 1. Frequência de amostras positivas e negativas para *Ureaplasma diversum* nas amostras de muco vulvovaginal, conforme positividade para *E. coli* e CCS ($\times 10^3$) e CBT($\times 10^3$), nas nove propriedades estudadas.



diversum, e 9,9% foram positivas para *E. coli*. Nos SPL 2 e 3 verificou-se as maiores freqüências para o *U. diversum*. Nos SPL 8 e 9 verificou-se elevada freqüência de isolamentos positivos para *U. diversum*, *E. coli*, CBT e CCS. Nos SPL 3 e 9 verificou-se altos valores de CCS e CBT. Nos SPL 2, 3, 6 e 7 ocorreu maior freqüência de *U. diversum*. Destes, o retiro de número 2 utilizava sistema de ordenha mecânica em fila indiana e os demais utilizavam a ordenha manual.

Analisando estatisticamente a CBT, especialmente no retiro 5, foi detectado, significativamente com $\chi^2 = 5,93$ e $p > 0,05$ que a contagem bacteriana total \geq a 20.000 ufc/mL é considerada como fator de exposição para a ocorrência do *U. diversum*, entretanto esta relação não foi significativa para a CCS, onde $\chi^2 = 0,005$ e $p > 0,05$ para a contagem de células somáticas \geq 300.000 cel/mL não indicaram fator de exposição para a positividade do agente.

As TABELAS 2 a 6 e as FIGURAS 1 e 2 mostram os resultados da regressão logística para a ocorrência dos fatores e os casos positivos para o *U. diversum*.

TABELA 2. Fatores observados nas nove propriedades pesquisadas para as chances de risco de ocorrência do *Ureaplasma diversum*, conforme condições reprodutivas das vacas, grau de lesão e ocorrência de *Mycoplasma spp* e *E. coli*.

Sistema de produção	Vacas colhidas		Em lactação		Prenhes		Grave		M/U positivo		U. diversum positivo		E. coli Positivo	
	N	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%
	1	12	2,4	11	3,0	2	0,8	1	11,1	0	0,0	0	0,0	1
2	108	21,3	108	29,0	63	26,7	5	55,6	79	35,0	57	34,5	5	10,9
3	47	9,3	28	7,5	14	5,9	0	0,0	28	12,4	25	15,2	1	2,2
4	38	7,5	28	7,5	13	5,5	0	0,0	16	7,1	12	7,3	0	0,0
5	46	9,1	26	7,0	30	12,7	3	33,3	23	10,2	15	9,1	2	4,3
6	33	6,5	32	8,6	2	0,8	0	0,0	14	6,2	12	7,3	1	2,2
7	26	5,1	15	4,0	0	0,0	0	0,0	12	5,3	11	6,7	0	0,0
8	98	19,4	59	15,9	52	22,0	0	0,0	20	8,8	10	6,1	13	28,3
9	98	19,4	65	17,5	60	25,4	0	0,0	34	15,0	23	13,9	23	50,0
Total	506	100	372	100	236	100	9	100	226	100	165	100	46	100

(M/U) *Mycoplasma spp* / *Ureaplasma diversum*

TABELA 3. Frequência de amostras positivas e negativas para *Ureaplasma diversum* nas amostras de muco vulvovaginal, conforme condição produtiva, reprodutiva, tipo e sistema de ordenha, das vacas testadas.

Fatores	Positivo		Negativo		Total
	n	%	n	%	
Seca	40	30,1	93	69,9	133
Lactante	134	36,0	238	64,0	372
Vazia	91	33,8	178	66,2	269
Prenhe	83	35,2	153	64,8	236
Ordenha Manual	48	45,3	58	54,7	106
Ordenha Mecânica	126	31,6	273	68,4	399
Balde Espinha	69	23,7	222	76,3	291
Fila Indiana	57	52,8	51	47,2	108

A frequência de animais portadores do *U. diversum*, esteve mais elevada nos maiores rebanhos, foi maior para aqueles ordenhados pelo sistema mecanizado em fila indiana, os quais apresentaram 52,8% de positividade, enquanto que os animais submetidos à ordenha manual obtiveram 45,3% de frequência para o *U. diversum*. Os animais que eram submetidos ao sistema mecanizado com balde-ao-pé ou espinha de peixe, apresentaram frequência de 23,7%. As lesões graves ocorreram com maior frequência no animais com infecção simultânea para *U. diversum*, *Mycoplasma spp* e *E. coli*

TABELA 4. Razão de chance de positividade para o *Ureaplasma diversum* nas amostras de muco vulvovaginal, conforme condição produtiva, reprodutiva, tipo e sistema de ordenha, da vacas testadas.

Fatores	n observado	<i>Ureaplasma diversum</i>					
		n positivo	%	OR	IC 95%		p
Seca	133	40	30,1	0,76	0,49	1,17	0,2100
Lactante	372	134	36,0	1,30	0,85	2,00	0,2100
Vazia	269	91	33,8	0,94	0,65	1,36	0,7500
Prenhe	236	83	35,2	1,06	0,73	1,53	0,7500
Ordenha Manual	106	48	45,3	1,79*	1,15	2,77	0,0001
Ordenha Mecânica	399	126	31,6	0,55*	0,36	0,86	0,0001
Balde / Espinha	291	69	23,7	0,27*	0,17	0,44	0,0001
Fila Indiana	108	57	52,8	3,59*	2,26	5,72	0,0001

OR = Odds ratio; IC 95% - Intervalo de confiança; p - Probabilidade associada à hipótese de nulidade e * $p < 0,05$.

A TABELA 4 traz a análise das chances de risco para a ocorrência do *U. diversum* conforme cada fator estudado. Analisando as condições reprodutivas das vacas testadas e a positividade do *U. diversum*, foi demonstrado que as

chances de risco, mesmo não sendo significativa ($P>0,05$), foram maiores para as vacas em lactação (1,30 vezes) quando comparadas com as secas (0,76 vezes) e os valores foram mais próximos para as vacas prenhes ou vazias (1,06 e 0,94).

Comparando os sistemas de ordenha verificou-se que fêmeas dos sistemas de produção de leite com ordenha mecânica apresentaram 0,55 mais vezes a chance de serem positivas que aquelas por ordenha manual. Quando se considerou o sistema de ordenha mecânica (espinha de peixe ou balde pé em relação à fila indiana), aquelas ordenhadas em fila indiana tiveram 3,59 vezes mais chance de serem positivas ($P<0,001$). Na ordem de chances seguem os animais submetidos à ordenha manual, com 1,79 vezes a chance de estarem positivos e os animais.

Conforme pode ser visto na TABELA 5 e FIGURA 2, dos 506 animais testados, 33 amostras foram positivas para *E. coli*, 472 forma negativas para *E. coli*; 226 foram positivas também para *Mycoplasma* spp, 496 apresentavam lesão de vulvovaginite leve a moderada e nove apresentavam lesão grave para vulvovaginite.

TABELA 5. Frequência de Amostras positivas e negativas para *U. diversum* nas amostras de muco vulvovaginal, conforme presença ou ausência de *E. coli*, isolamento misto de *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM) e grau de lesão das vacas testadas.

Fatores	<i>Ureaplasma diversum</i>				Total
	Positivo		Negativo		
	n	%	N	%	
<i>E. coli</i> (pos)	13	39,4	20	60,6	33
<i>E. coli</i> (neg)	161	34,1	311	65,9	472
UM	174	77,0	52	23,0	226
Leve	170	34,3	326	65,7	496
Moderada	4	44,4	5	55,6	9

UM = Positivo simultaneamente para *Mycoplasma* spp e *U. diversum*.

Comparando com a positividade do *U. diversum* com os prováveis fatores de exposição, foi verificado que 39,4% dos animais positivos para *U. diversum* foram positivos também para *E. coli*, 77,0% foram positivos para *Mycoplasma* spp. e 44,4% apresentaram lesão grave para vulvovaginite.

FIGURA 2. Freqüência de amostras positivas e negativas para *U. diversum* conforme presença ou ausência de *E. coli*, grau de lesão e amostras mista com *Mycoplasma spp* (UM), dos rebanhos testados.

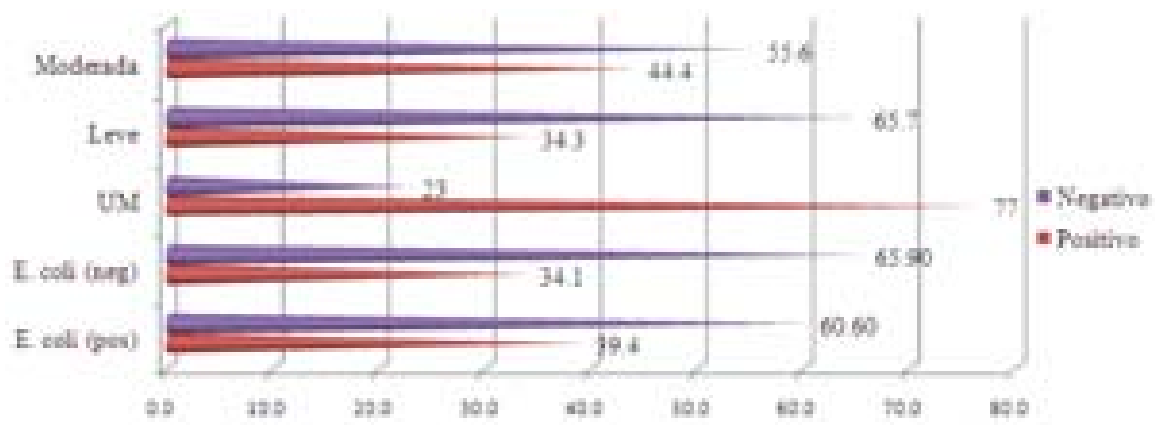


TABELA 6 . Razão de chance de positividade para o *Ureaplasma diversum* nas amostras de muco vulvovaginal, conforme a presença de *E. coli* e o grau de lesão de vulvovaginite observados nas vacas testadas.

Fatores	n observado	<i>Ureaplasma diversum</i>					
		n comparado	%	OR	IC 95%	P	
<i>E. coli</i> (pos)	33	13	39,4	1,25	0,60 - 2,58	0,53	
<i>E. coli</i> (neg)	472	161	34,1	0,79	0,38 - 1,64	0,53	
Leve	496	170	34,3	0,65	0,17 - 2,45	0,52	
Moderada	9	4	44,4	1,53	0,40 - 5,78	0,52	

OR = Odds ratio; IC 95% - Intervalo de confiança; p - Probabilidade associada à hipótese de nulidade.

Na TABELA 6 pode ser verificado que o estudo de chance de risco (OR) para os fatores de exposição não apresentaram resultados significativos para os fatores analisados, mas existe chance de que os animais positivos para *E. coli* apresentem 1,25 vezes a chance de serem positivos para *U. diversum* e os animais com vulvovaginite caracterizada como lesão grave apresentam também 1,53 vezes a chance de estarem positivos para o agente em questão.

4. DISCUSSÃO

Nas fazendas visitadas foi verificado que a infra-estrutura para os procedimentos de ordenha eram bastante variados e que em cinco propriedades não havia correspondência entre as instalações e as orientações prestadas pela Instrução Normativa nº 51 de 18/09/2002 (BRASIL, 2002) para a produção de leite tipo C. A falta de correspondência mais relevante para a questão sanitária foi a ocorrência de propriedades com piso de chão batido, o qual compromete a qualidade de higienização do galpão de ordenha. Aquela Instrução Normativa propõe que os galpões sejam higienizados utilizando jatos com água e sanitizantes, porém somente duas propriedades utilizavam este procedimento. RIBEIRO et al. (2009) chamam a atenção para as características higiênicas no sistema de produção de leite, alertando que as boas práticas higiênicas resultam na prevenção para instalação de microrganismos contagiosos e asseguram melhor qualidade do leite comercializado.

Outro achado relevante para o processo de disseminação de agentes infecciosos é a localização das esterqueiras. A maioria (oito) estava localizada a menos de 50 m de distância do galpão de ordenha, descobertas e sem nenhum tipo de tratamento. MONTEIRO NOVO & SCHIFFLER (2006) afirmam que as esterqueiras devem ser posicionadas longe das salas de ordenha e ENRIQUEZ et al., (2007), discutindo a importância do esterco como potencial disseminador de microrganismos, propõe que as esterqueiras, quando próximas da sala de ordenha, sejam acondicionadas em associação com palha vegetal a fim de minimizar os riscos de contaminação.

As frequências de lesões de VVG aqui descritas são superiores aquelas relatadas por NASCIMENTO et al., (2005). Os autores isolaram *Mycoplasma* spp. a partir de amostras de muco vaginal de fêmeas bovinas com problemas reprodutivos e identificaram 7,14% de amostras positivas em animais com VVG discreta e que abortaram, e 7,14% de amostras positivas em animais com VVG, sem distúrbios reprodutivos. Comparando os resultados verifica-se que a VVG discreta, a qual se referem aqueles autores, corresponde à VVG de lesão leve, detectada em 98,2% das vacas testadas neste estudo. No trabalho de NASCIMENTO et al., (2005), os autores obtiveram o diagnóstico negativo para

Tricomonose, Campilobacteriose e Brucelose, concluindo que os distúrbios reprodutivos detectados foram relacionados com a presença de *Mollicutes*.

BUZINHANI et al. (2007), utilizando técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) específico, isolaram 37,5% de *U. diversum* das amostras de muco vulvovaginal de vacas com distúrbios reprodutivos e CARDOSO et al. (2000), comparando a técnica de PCR e de cultivo microbiológico, identificaram 52.9% e 35.7%, respectivamente, em amostras vaginais de 168 fêmeas bovinas. PETIT et al., (2008), utilizando isolamento microbiológico, testes bioquímicos e sorológicos identificaram o agente em 19,9% das 261 amostras de swab vaginal. No presente estudo houve freqüência semelhante – 32,6%. BUZINHANI et al., (2007) testaram amostras de vacas holandesas com problemas reprodutivos em vários estados brasileiros e detectaram, por isolamento microbiológico e técnicas de PCR genérico, 63,4% de positividade para o *U. diversum* e 9,8% de positividade para o *M. bovis*, demonstrando uma probabilidade maior do *U. diversum* ser o principal agente envolvido nos processos patológicos investigados.

Nos resultados descritos neste trabalho verificou-se que propriedades com maiores valores de CCS apresentaram também os maiores valores de CBT e maior freqüência de *E. coli*. Os dados de CCS e CBT não chegam a comprometer as orientações propostas pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2000), porque ela prevê um nível máximo atribuído para CCS e CBT de 750.000 cel/mL e 750.000 ufc/mL, respectivamente, para a região Centro-Oeste, até 2010. OLIVAL et al., (2004), avaliando propriedades produtoras de leite tipo C, encontraram maior freqüência (88,8%) de unidades produtoras com valores para CBT acima de 100.000 ufc/mL e 77,7% das unidades produtoras apresentaram CCS acima de 400.000 cel/mL. Os valores encontrados neste estudo estão abaixo desses, assim como dos sugeridos pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2000).

Mesmo assim, considerando a freqüência elevada da *E. coli*, os dados sugerem comprometimento das condições higiênicas durante os procedimentos de ordenha. Ao analisar estatisticamente estes fatores verificou-se que a CBT esteve associada à maior ocorrência do *U. diversum*. A presença de *E. coli* e *U. diversum* nas amostras processadas, expressando valores de freqüência e de fator de exposição relevantes denota o papel de interação sinérgica entre bactérias Gram negativas que tendem a comprometer o sistema reprodutor das

fêmeas de produção quando ocorrem simultaneamente. Este papel sinérgico foi discutido por SPRINGER et al., (1974), e observado em relação aos *Mollicutes* e os estreptococos nas lesões ulcerativas do trato genital de eqüídeos (SPERGSER et al. (2002) e com a *P. multocida* em distúrbios respiratórios promovidos por micoplasmas em fêmeas bovinas (MAUNSELL & DONOVAN, 2009).

Como foi observado na análise de chance de risco, a positividade para *E. coli* e a presença de lesão grave representam chance de risco para o isolamento do *U. diversum*. A chance de risco estabelecida entre o padrão de lesão grave e a ocorrência do *U. diversum* sugere o que é caracterizado como fase aguda da vulvovaginite, como proposto por DOIG et al. (1980) que observaram experimentalmente a resposta inflamatória em novilhas nulíparas holandesas, através da inoculação de *U. diversum* no útero e cérvix. O isolamento microbiológico nesse experimento permitiu a obtenção do agente em 94% das amostras em até 4 dias pós inoculação, com redução completa desta freqüência em até 7 dias pós inoculação.

As lesões graves ocorreram principalmente nas fêmeas prenhes e positivas para *Mycoplasma* spp. Além do papel sinérgico entre as bactérias Gram negativas e os ureaplasmas, devido a similaridade das proteínas de suas membranas (BRENNER et al., 1997), é discutível também a habilidade do sistema imunológico em responder a estes agentes. Fêmeas gestantes estão imunologicamente suprimidas com a circulação de células T e B reduzidas, especialmente para o sistema reprodutor a fim de minimizar o papel de rejeição aos antígenos paternos adquiridos durante a concepção. Este mecanismo resulta na maior predisposição para a instalação e multiplicação do *U. diversum*, principalmente porque, sendo Gram negativo ele dispõe dos mecanismos de escape à fagocitose descrita por POWELL & CLYDE, (1975) enquanto estão no meio extra celular, na mucosa do trato reprodutor. Posteriormente, ao invadir as células, o sistema imune suprimido teria maior dificuldade para reconhecê-lo e destruí-lo. KWIECIEN & LITTLE (1991) descreveram que neste mecanismo de escape a bactéria Gram negativa tende a inibir o metabolismo oxidativo da célula hospedada, dificultando o processo de reconhecimento ao corpo estranho e ainda conseguindo se multiplicar no interior da mesma.

5. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que dentre os fatores estudados, representam potenciais fatores de risco para isolamentos positivos de *U. diversum* no rebanho:

- ✓ Lesões de VVG grave;
- ✓ vacas ordenhadas manualmente;
- ✓ vacas ordenhadas mecânicamente em fila indiana;
- ✓ presença concomitante de *e. coli* em amostras de muco vulvovaginal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, L.A.; DO; ISA, H., DIAS, L.T.; ROSSI JR, O.D.; NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Belo Horizonte. v. 24, n. 4, p. 173-177. 2004.
2. ANDERSON, Mark L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*, London. n. 68, p. 474–486. 2007.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 set. 2002. Seção 3. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/in51.htm> >. Acesso em: 12 de novembro de 2009.
4. BRENNER, C.; WROBLEWSKI, H.; HENAFF, M.L.; MONTAGNIER, L.; BLANCHARD, A. Spiralin, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces t-cell-independent b-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. *Infection and Immunity*, Washington. v. 65, n. 10. p. 4322–4329, 1997.
5. BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L.W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural*, Santa Maria. v. 35, n. 4, p. 848-854, 2005.
6. 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*, Minas Gerais. v. 59, n. 6, p. 1368-1375, 2007.
7. CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L.M.P.S; TEIXEIRA, S.R.; GENOVEZ, M.É. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian cows and heifers; first report. *Animal Reproduction Science*, London. v. 3-4, n. 1, p. 137-143, 2000.
8. CARDOSO, M.V.; VASCONCELLOS, S.A. Importância das micoplasmoses na fertilidade de touros - Artigo de revisão. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. v.71, n. 2, p. 257-265, 2004.

9. CHELMONSKA-SOYTA, A.; KATSKA, L.; KURPISZ, M.; STEFANIAK, T.; ZIMECKI M. The effect of *Ureaplasma diversum* activated mononuclear leukocytes on the development and interferon- τ production by bovine IVF-derived embryos. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 51, n. 2, p. 145-158, 2001.
10. CERDÁ, R.; XAVIER, J.; SANSALONE, P.; SOTA, R.L.; ROSENBUSH, R. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* a Partir de un Brote de Mastitis Bovina en una Vaquería de la Provincia de Buenos Aires. Primera comunicación en la República Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Argentina. n. 42, p. 7-11, 2000.
11. CORDEIRO, R. O mito da doença rara. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 111-116, 2005.
12. DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C. Bovine Granular Vulvitis Associated with Ureaplasma Infection *The Canadian Veterinary Journal*. v. 20, n. 4, 1979.
13. DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C.; Experimental bovine genital ureaplasmosis. I. Granular vulvitis following vulvar inoculation. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Canadá. p. 8-258, 1980.
14. ELAD, D.; FRIEDGUT, O.; ALPERT, N.; STRAM, Y.; LAHAV, D.; TIOMKIN, D.; AVRAMSON, M.; GRINBERG, K.; BERNSTEIN, M. Bovine Necrotic Vulvovaginitis Associated with *Porphyromonas levii*. *Emerging Infectious Diseases*. v.10, n.3, p. 505-507, 2004.
15. ENRIQUEZ, D.; HONORATO, L.; COSTA, J.; HÖTZEL, M.J.; MACHADO DA ROSA, A.C. Avaliação da adoção de práticas de manejo do rebanho leiteiro no processo de Transição para a criação animal agroecológica. *Revista Brasileira de Agroecologia*, Porto Alegre. v. 2, n. 2, p. 120 – 123, 2007.
16. FOX, L. K; HANCOCK, D. D; MICKELSON, A; BRITTEN, A. Bulk Tank Milk Analysis: Factors Associated with Appearance of *Mycoplasma* sp. in Milk. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, Berlim. n. 50, p. 235–240, 2003.
17. 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*, Netherlands. n. 41, p. 1421–1426, 2009.
18. GIVENS, M.D.; MARLEY, M.S.D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*, London. n. 70, p. 270–285, 2008.
19. HUSTED, J.R. *Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis*. Texas A&M University: Veterinary Microbiology. [Thesis]. 2003. 29p.
20. KWIECIEN, J.M.; LITTLE, P.B. *Haemophilus somnus* and reproductive disease in the cow: A review. *The Canadian Veterinary Journal*. n. 32, p. 595-601, 1991.
21. LE GRAND, D.; POUMARAT, F.; MARTEL, J.L. Infectious genital disease by *Ureaplasma diversum*, investigations on bovine in France. *Veterinary Research*, Holanda. v. 26, n.1, p.11-20, 1995.
22. MAUNSELL, F.P; DONOVAN, G. A.; *Mycoplasma bovis* Infections in Young Calves. *Clinics of North America - Food Animal Practice*, USA. n. 25, p. 139–177, 2009.
23. MONTEIRO NOVO, A.L, SCHIFFLER, E. A. *Princípios básicos para a produção econômica de leite*. Documentos 49. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 2006. 33p.
24. MORRELL, E.L; MOORE, D.P; ODEÓN, A.C; POSO, M.A; ODRIÓZOLA, E; CANTÓN, G; PAOLICCHI, F; MALENA, R; LEUNDA, M.R; MORSELLA, C; CAMPERO, C.M. Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from Balcarce, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. n. 40, p.151-157, 2008.
25. NANDI, S.; KUMAR, M.; MANOHAR, M.; CHAUHAN, R.S. Bovine herpes virus infections in cattle. *Animal Health Research Reviews*, Reino Unido. n. 10, v. 1; p. 85–98, 2009.
26. 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*, Rio Grande do Sul. n. 33, p. 195-199. April 2005.
27. OLIVAL, A.A.; SPEXOTO, A.A.; MANO, G.B.; SANTOS, M.V. avaliação das limitações para melhoria da qualidade do leite na região de Pirassununga-SP. *Ciência em Extensão*, São Paulo. v. 1, n. 2, 2004.

28. 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.
29. OLIVEIRA, S.J. *Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária* – Canoas: ULBRA. 1995. 139p.
30. DPA – *Dairy Partners Américas*. Disponível em: <http://www.dpamericas.com.br/home.aspx>. Acessado em 20 de novembro de 2009. [Acesso restrito].
31. PETRIE, A.; WATSON, P. *Estatística em Ciência Animal e Veterinária*. 2ª ed. São Paulo: Rocca. 2009. 235p.
32. PETIT, T; SPERGSEER, J; AURICH, J; ROSENGARTEN, R. Prevalence of *Chlamydiaceae* and *Mollicutes* on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. *Veterinary Microbiology, USA*. v. 127, n. 3-4, p. 325-333, 2008.
33. PETIT, T; SPERGSEER, J; AURICH, J; ROSENGARTEN, R. Examination of semen from bulls at five Austrian artificial insemination centres for chlamydiae and mollicutes. *Veterinary Record, London*. n. 162, p. 792 – 793, 2008(a).
34. PETIT, T; SPERGSEER, J; ROSENGARTEN, R. AURICH, J. Prevalence of Potentially Pathogenic Bacteria as Genital Pathogens in Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals, USA*. n. 44, p. 88–91, 2009. 91.
35. POWELL, D.A.; CLYDE Jr., W.A. Oponin-reversible resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to in vitro phagocytosis by alveolar macrophages. *Infection and Immunity, Washington*. v.11, n.3, p.540-550, 1975.
36. RIBEIRO, M.G.; JULIANA, S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Belo Horizonte*. v. 29, n. 1, p. 52-58, 2009.
37. SANDERSON, M.W.; CHENOWETH, A.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, London*. ISSN: 0093-691X. n. 54, p. 401-408, 2000.

38. SILVA, E.; MENEZES, E.M.. *Metodologia da Pesquisa e Elaboração de Dissertação*. 3. ed., Florianópolis: Laboratório de Ensino a Distância da UFSC, 2001.
39. SPERGSE, J.; AURICH, C.; AURICH, J.E.; ROSENGARTEN, R. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Veterinary Microbiology*, USA. ISSN: 0378-1135. v. 87. p. 119–129. 2002.
40. SPRINGER, W.T.; LUSKUS, C.; POURCIAU, S.S. Infectious bronchitis and mixed infections of *Mycoplasma synoviae* and *Escherichia coli* in gnotobiotic chickens - synergistic role in the airsacculitis syndrome. *Infection and Immunity*, Washington. v. 10, n. 3, p. 578-589, 1974.
41. VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBE`S, C.; MONTEL, M.C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology*. n. 26, p. 305–310, 2009.

ANEXO

ANEXO 1. Ficha de inquérito epidemiológico aplicado junto às unidades produtoras de leite visitadas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
Cx.Postal 131-Campus II – Samambaia , CEP: 74001-970, Tel/Fax: (0xx 62) 521-1586

- FICHA DE INQUERITO -

Data: ___/___/_____ Nº da propriedade em visita _____

DADOS DA PROPRIEDADE

Nome da propriedade: _____

Endereço: _____

Nome da microrregião: _____

Dados edafoclimáticos da microrregião: temperatura- _____ °C / umidade - _____ %

Tipo de sistema de produção:

() *free-stall* () Extensivo com ordenha mecânica () Extensivo com ordenha manual

Características raciais das vacas: () Pura () Cruzada Raças: _____

Produção (litros/ano): _____ Produtividade (litros/vaca/ano): _____

Número de vacas no rebanho: _____ Produtividade (bezerro/vaca/ano): _____

Número de galpões utilizados para a ordenha: ()um ()dois ()três ()quatro ()+4

Lotação média do galpão por ordenha: ()15-30vacas ()30-45vacas ()45-60vacas ()+60

Tempo que as vacas permanecem nos galpões: ()1-3h ()3-6h ()todo o dia ()dia e noite

Tipo de cobertura do galpão: ()palha ()telha amianto ()telha barro ()outro

Tipo de piso do galpão: ()barro ()cimento ()madeira ()outro

Tipo de ventilação no galpão: ()ventiladores ()jatos de água ()aspersores ()nenhum

Forma de higienização do galpão: ()vassoura ()água ()sanitizantes ()nenhum

Freqüência de higienização do galpão: ()1xdia ()2xdia ()3xdia ()nenhuma

Destino dos excrementos: ()descoberto próximo do galpão[<50m] ()tanque de decantação
()descoberto distante do galpão [>50m] ()depósito coberto

CAPÍTULO III

FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma* spp E *Ureaplasma diversum* EM LESÕES DE VULVOVAGINITE GRANULAR EM VACAS EM LACTAÇÃO.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a ocorrência de isolamentos positivos para os *Mollicutes* - *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* no muco vulvovaginal de vacas em lactação, e associar este achado com fatores do animal e do meio ambiente, foram visitados seis retiros pertencentes a uma mesma propriedade produtora de leite a pasto para industrialização, localizada na mesorregião sul do Estado de Goiás. Foram utilizadas 733 vacas em lactação. Amostras de swab vulvovaginal foram incubadas por até 15 dias e avaliadas em microscópio estereoscópico, para visualização de colônias em forma de “ovo frito”, características dos micoplamas, confirmando-se pela coloração de Dienes. Para o *U. diversum*, verificou-se a atividade da urease pela alteração da cor do meio líquido (aumento do pH) e pela presença no ágar de pequenas colônias granuladas de coloração marrom escura. Das 733 vacas em lactação examinadas, 382 (52,1%) apresentaram algum grau de lesão, 70 (9,5%) foram positivas para *Mycoplasma* spp, 190 (25,9%) para *U. diversum*, 82 (11,2%) para ambos e 391 (53,3%) negativas. A raça Girolando sem padrão racial (RA3) predominou, representando 40% das vacas estudadas. A produção de leite mais baixa foi verificada no retiro 4 (8,2L/vaca/dia), e o menor número de vacas gestantes foi verificado no retiro 3. Quanto aos escores de higiene e manejo, verificou-se que em nenhum retiro foi observado o escore classificado como “ótimo”. O Grau de lesão mais freqüente foi o I, com 38,9%, e a lesão de Grau IV foi observada em 0,4% das vacas examinadas. Amostras positivas para *Mycoplasma* spp (UM1) e para *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM3), apresentaram correlação negativa ou fracamente positiva com a maioria dos fatores. Houve correlação moderadamente positiva entre a ocorrência do *Mycoplasma* spp (UM1), a raça Girolando 7/8 (RA1) e o escore corporal 1,5 (SV15). Não houve correlação significativa entre a sorologia positiva para *Neospora caninum* e *Leptospira interrogans* e nenhum dos fatores avaliados. Foi concluído que todos os retiros foram considerados positivos para a presença de *Mollicutes* - *Mycoplasma* spp e *U. diversum*, nas vacas em lactação; Foi possível estabelecer a associação entre a ocorrência desses *Mollicutes* e fatores relacionados ao animal, especialmente com a presença de VVG de grau mais leve, raça e escores de condição corporal; O escore de higiene do ordenhador foi o fator relacionado ao meio ambiente que apresentou maior associação com a presença de *Mollicutes* nos animais estudados; Não há associação entre a presença de *Mollicutes* e soropositividade para *Leptospira interrogans* e *Neospora caninum*; *Mycoplasma* spp e especialmente *U. diversum* devem ser considerados como agentes envolvidos no baixo desempenho reprodutivo de vacas em lactação.

Palavras chave: Higiene, manejo, *Mollicutes*, vaca.

ABSTRACT

In order to evaluate the occurrence of positive isolates for *Mollicutes* - *Mycoplasma* spp and *Ureaplasma diversum* vulvovaginal mucus of cows in milk, and associate this finding with factors of the animal and the environment, they visited six retreats from any one producing property milk of grazing land for industrialization, in the region south of the State of Goiás were used 733 lactating cows. Vulvovaginal swab samples were incubated for 15 days and evaluated in a stereomicroscope to visualize colonies into "fried egg", features the micoplamas it is confirmed by staining of Dienes. For *U. diversum* verified the urease activity by changing the color of the liquid medium (pH adjustment) and agar in the presence of small granular colonies of dark brown color. Of the 733 lactating cows examined, 382 (52.1%) had some degree of injury, 70 (9.5%) were positive for *Mycoplasma* spp, 190 (25.9%) for *U. diversum*, 82 (11.2%) for both and 391 (53.3%) negative. The Girolando no racial pattern (RA3) predominated, representing 40% of the cows studied. Milk production was recorded lower in retreat 4 (8.2 L / cow / day), and the smaller number of cows pregnant was found at the retreat 3. As for the scores of hygiene and management, it was found that at no retreat was observed score classified as "excellent". The degree of injury was the most frequent I, with 38.9% and Grade IV injury was observed in 0.4% of cows examined. Samples positive for *Mycoplasma* spp (UM1) and *Mycoplasma* spp. and *U. diversum* (UM3), had a negative or weakly positive with the majority of factors. There was a moderate positive correlation between the occurrence of *Mycoplasma* spp (UM1), the Girolando 7 / 8 (RA1) and body condition score 1.5 (SV15). There was no significant correlation between seropositivity for *Neospora caninum* and *Leptospira interrogans* and none of the factors evaluated. It was concluded that all the retreats were considered positive for the presence of *Mollicutes* - *Mycoplasma* spp and *U. diversum* in lactating cows was possible to determine the association between the occurrence of *Mollicutes* and factors related to the animal, especially with the presence of grade VVG lighter, race and body condition scores, the score of the milker hygiene was the factor related to the environment with the highest association with the presence of animals studied *Mollicutes*; No association between the presence of *Mollicutes* and seropositivity for *Leptospira interrogans* and *Neospora caninum*; *Mycoplasma* spp and *U. diversum* especially should be considered as agents involved in low reproductive performance of lactating cows.

Key-words: Hygiene, management, *Mollicutes*, cow.

CAPÍTULO III

FATORES ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA DE *Mycoplasma* SPP E *Ureaplasma diversum* EM LESÕES DE VULVOVAGINITE GRANULAR EM VACAS EM LACTAÇÃO.

1. INTRODUÇÃO

O rebanho leiteiro do Brasil tem crescido expressivamente nos últimos anos (COSTA et al., 2005). Este evento tem sido acompanhado, previsivelmente, pelo aumento na produção láctea (FERNANDES et al., 2004). Entretanto as mudanças não são apenas em relação ao crescimento do rebanho mas, também tem-se verificado que através das modificações técnicas e do melhoramento genético, o número de vacas ordenhada tem diminuído e o volume de leite produzido continua aumentando (MASSUQUETO et al., 2007). Em Goiás a produção láctea está em torno de 2 bilhões litros/ano (BUENO et al., 2005). O tipo de sistema predominante é a produção de leite a pasto (93,1%), caracterizada por apresentar 80% da dieta animal proveniente de pastagens. Nessas condições de produção de leite, 93,6% do rebanho é constituído por animais mestiços, cruzamentos de raças européias, principalmente a holandesa com raças zebuínas, principalmente Gir e Nelore (PACIULLO et al., 2005). As unidades produtoras de leite em Goiás têm importado animais de raças melhoradas de outros estados. Estas medidas aumentaram a predisposição do rebanho local em desenvolver doenças próprias dos animais que são submetidas aos altos índices de produção e também a novos patógenos quando introduzidos por bovinos contaminados (BUENO et al., 2005).

Os fatores que se interrelacionam com o aumento da produtividade leiteira, tais como nutrição, produção, sanidade, gerenciamento, genética e tecnificação (KRUG, 2001) oferecem maior eficiência produtiva, porém exigem maior qualidade sanitária e de manejo. É descrito que o manejo em relação aos animais de produção, principalmente no período pós-parto, é fator determinante para o controle das infecções do trato reprodutivo que levariam ao atraso nos serviços subseqüentes (ANDRADE et al., 2005). Neste perfil das unidades leiteiras passou-se a exigir ainda mais da atenção sanitária e do manejo. Animais de maior produtividade são manejados com maior freqüência, são submetidos a

situações de estresse e permanecem aglomerados durante a maior parte do tempo. Estes são fatores que expõem os animais de produção ao estresse comportamental, o que resulta em redução das defesas imunológicas por alteração da fisiologia natural do sistema endócrino (KEYSERLINGK et al., 2009). Reconhecer os fatores que predisõem o rebanho ao estresse e promover medidas de controle a estes fatores é a forma mais adequada para manejar o rebanho e obter resultados positivos, principalmente em relação aos índices reprodutivos, os quais representam a prioridade na qualidade de produção de uma unidade leiteira (MOBERG, 1975). Distúrbios sanitários, especialmente aqueles relacionados ao sistema reprodutivo, se tornam um dos principais fatores a comprometer a eficiência produtiva do rebanho leiteiro (JUNQUEIRA et al., 2006), fazendo com que os cuidados relacionados às taxas de cobertura, prenhez, natalidade, mortalidade e produtividade sejam verificados cuidadosamente no controle de qualidade produtivo do rebanho (FERNANDES et al., 2004), a fim de que a ocorrência de patologias possam ser reconhecidas e controladas efetivamente.

Diferentes fatores de estresse relacionados com a alta produção de leite (fisiológicos, ambientais), a ingestão inadequada de nutrientes, condição corporal baixa, e sistemas de manejo improvisados prejudicam o desempenho reprodutivo em gado leiteiro. Nas últimas décadas, a elevação contínua da produção média de leite foi registrada para todos os sistemas de produção de bovinos leiteiros. Por outro lado, uma simultânea e dramática diminuição no desempenho reprodutivo começou a ser registrado, principalmente por causa do aumento da incidência de doenças. Distúrbios como a redução na taxa de prenhez, ocorrência de anestro, baixa taxa na concepção e aumento na taxa de descarte passaram a se tornar típicas para estes rebanhos (TÓTH et al., 2006; GÁBOR et al., 2008). TILLARD et al. (2008) apontam a condição corporal e a produção de leite como fatores fortemente associados ao risco de insucesso ao primeiro serviço para vacas de leite no período pós-parto.

Vários microrganismos agem de forma isolada ou em conjunto como causa de distúrbios reprodutivos em ocorrências de produção. Vaginites, cervicites e infecções uterinas são causas freqüentes de morte embrionária, aborto e nascimentos prematuros quase sempre acompanhados de óbito

(HUSTED, 2003). Uma das respostas mais evidentes no processo inflamatório agudo no sistema reprodutor é a vulvovaginite. Inicialmente esta inflamação foi relacionada com a ocorrência do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BHV-1) (WENTINK et al., 2000; VAN SCHAİK et al., 2002; DEL FAVA et al., 2003 e ANDERSON, 2007), entretanto, exames bacteriológicos e sorológicos realizados em rebanhos com vulvovaginite em variados escores, apontaram que o processo não é uma reação restrita ao BHV-1 e que o processo inflamatório estaria relacionado a outros microrganismos, principalmente em rebanhos onde o BHV-1 não é positivo (BLUM et al., 2007). Em função destas questões, é importante conhecer os agentes que estariam causando estas perdas, a fim de efetuar medidas terapêuticas e preventivas.

Os *Mollicutes* estão entre os microrganismos mais relacionados com a ocorrência da vulvovaginite em rebanhos bovinos (BUZINHANI et al., 2007). Dentre os *Mollicutes* isolados a partir de amostras do trato reprodutivo de ocorrências bovinas com distúrbios da reprodução o *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* e *Ureaplasma diversum* têm sido considerados como os mais importantes (PETIT et al., 2008). Da mesma forma, estes são os *Mollicutes* mais frequentemente isolados de amostras seminais oriundas de touros alojados em centrais de inseminação artificial (CARDOSO et al., 2006; PETIT et al., 2009). Nos machos os *Mollicutes* têm sido apontados como comensais comuns da flora genital e as falhas reprodutivas seriam dependentes da virulência da cepa envolvida (SPERGSEER et al., 2002).

É conhecido que a espécie do *U. diversum* é composta por 11 sorovares subdivididos em 3 sorogrupos, os quais são: A, B e C (Le GRAND et al. (1995), porém o gene que determina a virulência permanece em estudo (MADSEN et al., 2008). Nas unidades de produção estas espécies estão relacionadas com a ocorrência de infertilidade, abortos e de lesões do tipo vulvite granular e vulvovaginite (VVG) em vacas. Pesquisa feita no Brasil, com amostras de ocorrências com estas patologias, demonstrou o isolamento de *Mycoplasma* spp. em 12,5% e de *U. diversum* em 25,0% das amostras de muco vulvovaginal (BUZINHANI et al., 2007). Estudo de frequência de vulvovaginite e de *U. diversum* em ocorrências de produção na França, demonstrou de 17% a 25% de lesões de

vulvovaginite nas vacas com problemas reprodutivos e de 38% a 45% de frequência do *U. diversum* nestas mesmas vacas (BEY, 2006).

O *Mycoplasma bovis*, quando presente no sistema de produção de leite, poderá participar de várias enfermidades que contribuem de forma significativa para a queda na produtividade. Qualquer animal poderá ser o portador e a infecção se manifestará conforme os fatores de risco mais evidentes na propriedade. Bezerros jovens apresentarão distúrbios respiratórios, principalmente quando forem alojados em ambientes de baixa ventilação e alta densidade animal (MAUNSELL & DONOVAN, 2009). Um número substancial de isolamentos de *M. bovigenitalium* e *M. canadense* foi obtido durante surtos de vulvovaginite em vacas de leite, apoiando a hipótese de que eles podem estar significativamente envolvidos em lesões da mucosa vulvovaginal (LYSNYANSKY et al., 2009). O *Ureaplasma diversum* é um patógeno oportunista do trato genital de bovinos que contribui para surtos de vulvite granular, aborto e infertilidade nos rebanhos, e pode levar à morte embrionária precoce, o que é provavelmente uma das razões de maior significado para a redução do desempenho reprodutivo em bovinos. A inoculação experimental deste patógeno no útero resultou em endometrite e salpingite, sugerindo que o estado inflamatório no trato reprodutivo, desencadeado pelo *U. diversum* pode ser desfavorável para o desenvolvimento do embrião e responsável pela falha reprodutiva (CHELMONSKA-SOYTA et al., 2001).

As infecções por *Mollicutes* são favorecidas por vários fatores, entre eles a alta densidade, uma vez que o agente presente nas secreções nasais ou vaginais se propaga de forma horizontal, facilmente pelo contato. O agente pode ser transmitido também pela propagação pelos fômites durante a ordenha de vacas infectadas e não infectadas, por equipamentos de ordenha tocando tetos mal higienizados, as mãos do ordenhador ou a falta de higiene durante a infusão intramamária de antibióticos (MAUNSELL & DONOVAN, 2009). O animal após a infecção poderá se recuperar espontaneamente desenvolvendo imunidade e tornando-se protegido. Este evento faz com que os índices da manifestação do agente sejam menores do que a positividade no rebanho (AL-MOMANI et al., 2008).

O papel dos *Mollicutes* no baixo desempenho reprodutivo dos bovinos tem sido discutido de diferentes maneiras, e a relação entre a ocorrência de micoplasmas e os distúrbios reprodutivos foi descrita há mais de três décadas (LANGFORD, 1975; SANDERSON et al., 2000). MULIRA et al. (1992) não obtiveram associação entre a presença destes agentes e infertilidade, e Le GRAND et al. (1995), embora tenham obtido isolamento positivo de *Ureaplasma diversum* em 74% das amostras estudadas, não verificaram associação entre os casos positivos e lesões vulvares ou baixo desempenho reprodutivo em vacas de leite. DOIG et al. (1979), relataram que a duração e a severidade das lesões promovidas pelo *U. diversum* são variadas. Afirmaram também que durante a fase aguda, os efeitos sobre as taxas de concepção são severos porém, durante a fase crônica estes índices são pouco esclarecidos. Por outro lado, CARDOSO et al. (2000), após estudar a ocorrência do *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos concluíram que este agente estava envolvido nos problemas estudados, apresentando também relação positiva com a VVG. OLIVEIRA FILHO et al. (2005) verificaram associação positiva entre VVG, isolamento positivo para *Ureaplasma diversum* e repetição regular de estro, em vacas em lactação.

PETIT et al. (2008), após estudar 375 fêmeas leiteiras com histórico de abortamento, endometrite e vaginite concluíram que, dentre os *Mollicutes* mais comumente isolados de bovinos, apenas o *Ureaplasma diversum* estaria mais associado à VVG, da mesma forma que GAMBARINI et al. (2009), que também relataram maior número de amostras positivas para *Ureaplasma diversum* em amostras de novilhas com lesões de VVG. Já LYSNYANSKY et al. (2009) obtiveram 11 amostras positivas para *Mycoplasma bovis* em muco vaginal de 20 vacas durante um surto de VVG.

LEÓN et al. (1995) estudaram a prevalência de *Ureaplasma diversum* na Costa Rica, e verificaram que o maior número de amostras positivas eram provenientes de animais jovens, com dois a tres partos, os quais mostraram 2,99 vezes mais risco de estarem infectados que os mais velhos.

A *Leptospira interrogans*, especialmente do sorotipo Hardjo é outro agente responsabilizado por infecções persistentes nos rebanhos. Os outros sorovares são descritos como causadores de infecções esporádicas. Após a

infecção os sorovares tendem a permanecer nos túbulos proximais dos rins e são disseminados no ambiente pela urina. Nos animais infectados pelo sorovar Hardjo as manifestações clínicas vão desde a significativa queda na produção de leite pela mastite clínica a abortos devido a predileção deste sorovar pelo trato genital (GIVENS, 2006). A leptospirose é geralmente associada com abortos, mas também aos partos prematuros, nascimento de bezerros fracos e mortalidade neonatal. A associação da infecção por *Leptospira* spp com problemas clínicos reprodutivos pode ser dificultada pelo fato de que não só seu isolamento é difícil, como também as técnicas de diagnóstico disponíveis são de baixa sensibilidade e especificidade (MORRELL et al., 2008).

Os abortos por neosporose também são freqüentes em bovinos, especialmente onde há maior promiscuidade animal. A perda fetal ocorre geralmente no segundo trimestre, podendo ocorrer, porém, em qualquer outro estágio gestacional. A transmissão transplacentária é a forma mais comum de disseminação do *Neospora caninum*, mantendo a infecção por várias gerações (CASTRO, 2006). Existem evidências de que os animais mais jovens o transmitem mais facilmente. Os cães domésticos são hospedeiros definitivos, os quais liberam oocistos nas fezes após se contaminarem ingerindo carne de roedores ou restos placentários de bovinos naturalmente infectados (GIVENS, 2006). Estudo sobre os fatores de risco para a neosporose bovina apontou que o agente esteve mais freqüente em propriedades rurais com exploração mista e criação extensiva. Não foi verificada relação entre a neosporose e o tipo de ordenha, porém houve associação significativa com os fatores relacionados ao manejo e às condições higiênicas (SILVA, 2008). A soropositividade para o *Neospora caninum* não significa que o animal esteja doente, é preciso associar outros fatores ambientais e biológicos para que o animal desenvolva distúrbios reprodutivos pela neosporose (ANDERSON, 2007)

Modificações no desempenho reprodutivo resultam em aumento na taxa de descarte involuntário, conseqüentemente, reduzindo a produção de leite e o número de bezerros. O senso comum seria melhorar a eficiência reprodutiva e para isso a ocorrência de doenças da reprodução deve ser minimizada (GRÖHN & RAJALA-SCHULTZ, 2000). Para otimizar o desempenho reprodutivo na pecuária de leite, o manejo integrado é considerado essencial. FOX et al. (2003)

ao detectarem a presença de *Mycoplasma* spp. em tanques de leite, especialmente naqueles de rebanhos maiores, advertiram que a vigilância epidemiológica em relação a ocorrência de micoplasmas deve ser efetiva, rápida e com resultados imediatos de identificação dos portadores para que as medidas primárias de sanidade possam ser efetivadas. Com a implantação dos sistemas de ordenha mecânica (ROSSING & HOGWERF, 1997), parâmetros relacionados ao manejo de ordenha, da higiene pré e pós ordenha, a higiene na sala de ordenha, assim como a detecção de outros fatores predisponentes, são elementos a serem cuidadosamente controlados a fim de minimizar a ocorrência de patógenos transmissíveis entre os animais de produção (VERDIER-METZ, 2009). Por outro lado, ao se conhecer os fatores de risco para determinada deficiência produtiva, é possível priorizar as medidas profiláticas necessárias para o controle desta deficiências (COENTRÃO et al., 2008)

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a ocorrência de isolamentos positivos para os *Mollicutes* - *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* no muco vulvovaginal de vacas em lactação, e associar este achado com fatores do animal e do meio ambiente, com base na hipótese de que a vaca em lactação é aquela mais predisposta ao efeito de microrganismos patogênicos ou oportunistas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS DE PRODUÇÃO

Foram visitados seis retiros pertencentes a uma mesma propriedade produtora de leite a pasto para industrialização, localizada na mesorregião sul do Estado de Goiás, Latitude $-16^{\circ} 37' 04''$, Longitude $48^{\circ} 57' 48''$, 948 metros acima do nível do mar. As visitas e colheitas ocorreram no mês de fevereiro de 2009, quando a temperatura média mensal foi de 31°C e a pluviosidade foi de 180mm.

Em todos os retiros os animais em produção eram mantidos a pasto, sob o mesmo manejo alimentar e sanitário, e ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia. Quanto ao manejo reprodutivo, um único inseminador era responsável por todas as fêmeas, visitando os retiros duas vezes ao dia. Os protocolos de sincronização de estro/ovulação não eram rotineiramente utilizados, sendo que apenas as fêmeas atrasadas recebiam este tratamento. O repasse com touros era feito com os mesmos machos, e a assistência técnica era feita pelo mesmo médico veterinário. A higienização das áreas de espera e salas de ordenha era feita pelo uso de jatos de água e os excrementos desviados pelo sistema de calha e lançados a distância maior que 50 metros da sala de ordenha. Durante a visita e colheita de material eram feitas as seguintes avaliações:

Quanto às condições produtivas do rebanho:

- Características raciais;
- condição reprodutiva das vacas em lactação;
- produtividade em litros de leite por dia, por vaca, a qual foi classificada em baixa quando a produção esteve entre 05 e 10 litros por dia e regular quando na faixa entre 11 e 20 litros por dia;
- tipo de reposição das vacas, se era feita com produtos locais ou com vacas procedentes de outras propriedades;
- animais que estavam ou não recebendo tratamento medicamentoso por mastite ou outras causas interrelacionadas;
- escore corporal das vacas testadas.

Adicionalmente foram obtidos dados relativos à utilização de dispositivos intra-vaginais e gestações obtidas por inseminação artificial ou repasse com touro.

Quanto ao local de ordenha:

- ✓ Infra-estrutura do galpão de espera;
- ✓ lotação média de cada galpão de ordenha;
- ✓ escore de manejo pré e pós ordenha;
- ✓ escore de higiene da sala de ordenha;
- ✓ escore de higiene do ordenhador;
- ✓ presença de outras espécies animais no galpão e/ou sala de ordenha.

Os escores de manejo pré e pós ordenha foram classificados em quatro categorias – ótimo, bom, regular e ruim - considerando a forma de condução dos animais do pasto para a sala de espera - uma ou mais pessoas, a cavalo ou não; condução da sala de espera para a sala de ordenha, e para fora dela - utilização de hastes de madeira ou equivalente para orientação dos animais, gritos ou outro tipo de sonorização; número de pessoas e de aparelho sonoro ligado durante a ordenha; número de animais na sala acima do número de conjunto de ordenha; presença de outros animais domésticos na sala ou imediações; período de permanência na sala de ordenha maior que 12 minutos; período de espera de retorno ao cocho de alimentação maior que 30 minutos. No processo de avaliação do escore de manejo foi considerado “sim” para a ocorrência do fator estressante e “não” para a ausência do fator observado. Os seis retiros foram observados separadamente.

Os escores de higiene da sala e do ordenhador também foram classificados nas quatro categorias descritas acima, considerando a limpeza da sala com água entre as entradas de animais, retirada frequente dos dejetos, utilização e destino de papel toalha, utilização do uniforme, do avental, de botas de borracha e higienização das mãos antes de lidar com o equipamento de ordenha.

2.2. ANIMAIS, OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE MATERIAL

Foram utilizadas 733 vacas em lactação. A colheita de material era feita durante a ordenha da manhã ou tarde. Inicialmente verificava-se a presença ou não de lesões típicas de vulvovaginite granular, as quais eram classificadas em quatro graus, de acordo com a quantidade e extensão na distribuição de vesículas, assim como presença ou não de hiperemia, conforme descrito por GAMBARINI et al. (2009).

As amostras de muco vulvovaginal eram obtidas com o auxílio de zaragatoas estéreis, de acordo com CERDÁ et al. (2000), depositadas em meio de transporte A_{3xB} e mantidas sob refrigeração. As amostras de sangue eram obtidas por punção da veia mamária, com o auxílio de agulhas descartáveis estéreis 40 x 12mm, com os animais ainda na linha de ordenha.

Todo material obtido era levado ao laboratório do Setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás para processamento. Dentro de 24 horas após a colheita o material vulvovaginal era inoculado em Caldo Ub e mantido sob incubação em tubos tampados em aerobiose em estufa a 37⁰ C, e em placas de Agar Ub e Agar Hayflick, incubadas em jarras de microaerofilia com vela acesa, em estufa a 37⁰ C conforme procedimento recomendado por CARDOSO et al. (2000). As placas eram incubadas por até 15 dias, e submetidas à primeira avaliação 48 horas após a inoculação em ágar, e posteriormente, a uma avaliação diária, em microscópio estereoscópico, para visualização de colônias em forma de “ovo frito”, características dos micoplamas, confirmando-se pela coloração de Dienes. Para o *U. diversum*, verificou-se a atividade da urease pela alteração da cor do meio líquido (aumento do pH) e pela presença no ágar de pequenas colônias granulosas de coloração marrom escura. As culturas consideradas negativas foram aquelas nas quais não foi possível observar alterações do pH do caldo e/ou aquelas nas quais não foram evidenciadas colônias características no ágar.

Para a identificação dos animais soropositivos para *Leptospira interrogans* e *Neospora caninum* amostras de sangue foram obtidas para pela punção da veia mamária (*vena subcutanea abdominis*) com o auxílio de agulhas descartáveis 40x12mm e acondicionadas em tubos de vidro, sem anticoagulante. O número de amostras de soro sanguíneo a ser analisado para *L. interrogans* e

N. caninum foi determinado pela prevalência esperada, utilizando o programa Win Episcopo 2.0 (BLAS et al., 2000), com margem de confiança de 95% e erro de 5%, com base nos dados de JULIANO et al., (2000) e MELO et al., (2006), colhendo-se 196 amostras. Nenhum dos animais testados recebeu previamente vacinação para leptospirose. As amostras de sangue total eram levadas ao Laboratório de Reprodução Animal da EV/UFG, centrifugadas a 2500rpm por cinco minutos e o soro obtido aliquoteado em frascos plásticos com capacidade para 2mL, e mantido sob congelamento a -20°C até o momento das avaliações.

A detecção de anticorpos para *Neospora caninum* foi feita utilizando-se a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) de acordo com ÁLVARES-GARCIA et al.. (2002), com diluição dos soros na proporção de 1:50. Em seguida foram adicionados à lâmina previamente fixada com taquizoítos da amostra NC-1 de *N. caninum*, cultivados em células Vero e utilizados como antígeno. A todas as lâminas examinadas foram adicionados controles positivos e negativos. A reação foi considerada positiva quando se observou fluorescência em toda a parede do taquizoíto, na diluição igual a 1:50.

Para identificação dos animais soropositivos para *Leptospira interrogans* utilizou-se a soroaglutinação microscópica (SAM). Após a triagem das amostras para cada sorovar, considerando-se reagentes as amostras que aglutinaram 50% ou mais das leptospirosas vivas contidas na solução antigênica, as mesmas foram testadas para definir o título de anticorpos para cada sorovar, que variou de 1:100 a 1:800. Da mesma forma, foram considerados títulos de amostras que aglutinaram 50% ou mais das leptospirosas vivas contidas na solução antigênica. A leitura das reações de aglutinação foi feita em microscópio de campo escuro. Os sorovares de *Leptospira interrogans* utilizados foram: *australis*, *bratislava*, *autumnalis*, *butembo*, *castellonis*, *canicola*, *djasiman*, *grippotyphosa*, *hebdomalis*, *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *pyrogenes*, *hardjo*, *wolffi*, *shermani*, *tarassovi* e *sentoti*.

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram tabulados considerando-se *Mollicutes* - *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* como variáveis dependentes e a VVG,

condições reprodutivas, produtivas e de manejo como variáveis independentes. Aplicou-se a correlação de Spearman, atribuindo-se postos a cada fator avaliado, utilizando o pacote computacional SAS (2003).

Para estabelecer a *chance de risco* para presença de *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* no muco vulvovaginal foi utilizado o cálculo da *Odds Ratio* segundo CORDEIRO (2005), utilizando-se o software livre Epi Info 2000 (2001). Para a tabulação dos dados utilizou-se a nomenclatura simplificada como aparece no QUADRO 1.

QUADRO 1. Legenda das siglas utilizadas para a elaboração das TABELAS de cálculos do teste de correlação de Spearman.

Abreviação	Legenda aplicada
UM1	Isolamento positivo para <i>Mycoplasma</i> spp
UM2	Isolamento positivo para <i>U. diversum</i>
UM3	Isolamento positivo para <i>Mycoplasma</i> spp e <i>U. diversum</i>
UM4	Isolamento negativo para micoplasmas
GL1	Negativo para lesões de vulvovaginite
GL2	Lesão de vulvovaginite de Grau I
GL3	Lesão de vulvovaginite de Grau II
GL4	Lesão de vulvovaginite de Grau III
RA1	Vacas da raça Girolando 7/8
RA2	Vacas da raça Girolanda ¾
RA3	Vacas da raça Girolanda sem padrão racial
RA4	Vacas da raça Jersey
RE1	Reposição das vacas com produtos locais
RE2	Reposição das vacas com produtos procedente de outras propriedades
PL1	Produtividade de leite = Baixa (entre 05 e 10 Litros por dia)
PL2	Produtividade de leite = Regular (entre 11 e 20 Litros por dia)
CV1	Condição reprodutiva da vaca = vazia normal
CV2	Condição reprodutiva da vaca = vazia atrasada
CV3	Condição reprodutiva da vaca = vazia inseminada
CV4	Condição reprodutiva da vaca = prenhe
TR1	Animais que não estão recebendo farmacoterapia
TR2	Animais em tratamento farmacoterápico
SV15	Escore corporal da vaca = 1,5
SV20	Escore corporal da vaca = 2,0
SV25	Escore corporal da vaca = 2,5
SV30	Escore corporal da vaca = 3,0
SV35	Escore corporal da vaca = 3,5
SV40	Escore corporal da vaca = 4,0
EH2	Procedimentos de higiene na vaca, antes da ordenha = Bom
EH3	Procedimentos de higiene na vaca, antes da ordenha = Ruim
ES2	Procedimentos de higiene na sala de ordenha durante e após a ordenha = Bom
ES3	Procedimentos de higiene na sala de ordenha durante e após a ordenha = Regular
ES4	Procedimentos de higiene na sala de ordenha durante e após a ordenha = Ruim
SC2	Procedimentos de manejo em relação aos animais = Bom
SC3	Procedimentos de manejo em relação aos animais = Regular
SC4	Procedimentos de manejo em relação aos animais = Ruim

3. RESULTADOS

Setecentas e trinta e três vacas em lactação foram examinadas para verificação da presença de lesões na mucosa vulvovaginal características da síndrome vulvovaginite granular (VVG), e igual número de amostras de muco foram obtidas e processadas para isolamento de *Mycoplasma spp* e *Ureaplasma diversum*. Destas, 382 (52,1%) apresentaram algum grau de lesão, 70 (9,5%) foram positivas para *Mycoplasma spp*, 190 (25,9%) para *U. diversum*, 82 (11,2%) para ambos e 391 (53,3%) negativas. Na TABELA 1 estão os dados relativos ao número de fêmeas em cada categoria, o padrão racial, produção de leite, animais gestantes e condição corporal das vacas examinadas, e na TABELA 2 os dados relacionados ao sistema de ordenha, escores avaliados e animais com lesão de VVG, em cada retiro.

TABELA 1. Valores unitários dos dados relacionados às condições produtivas, incluindo categoria das vacas, padrão racial, produção láctea, condição gestacional e corporal, para cada sistema de produção avaliado, em relação aos seis retiros testados.

Sistema de Produção	Número de ocorrências				Raça	Produção leite/vaca/dia /litros	Vacas gestantes	Condição corporal (média±EP)
	novilhas	secas	lactação	colhidas				
1	44	53	170	159	Girolando sem padrão racial	13,8	123	2,8±0,7
2	42	39	144	128	Girolando sem padrão racial	12,5	63	3,0±0,4
3	30	10	105	93	Jersey	11,4	21	2,5±0,5
4	49	44	159	152	Girolando ³ / ₄	8,2	80	2,5±0,2
5	31	17	95	63	Girolando ³ / ₄	11,6	50	2,6±0,3
6	89	61	158	138	Girolando ¹ / ₈	14,5	83	2,6±0,3
Total	285	224	831	733			420	

A raça Girolando sem padrão racial (RA3) predominou, representando 40% das vacas estudadas. A produção de leite mais baixa foi verificada no retiro 4 (8,2L/vaca/dia), e o menor número de vacas gestantes foi verificado no retiro 3.

TABELA 2. Dados relacionados ao número de animais utilizados, lotação da sala de ordenha, média do escore do ordenhador, da sala de ordenha, do manejo dos animais e a frequência de animais positivos para lesões de vulvovaginite (VVG).

Sistema de produção	Número de vacas	Lotação sala ordenha	Higiene da vaca antes da ordenha (EH)	Higiene na sala de ordenha (ES)	Manejo aos animais (SC)	Escore Corporal das vacas (Mo)	Animais com VVG (n,%)
1	159	12	2	2	2	2	40 (25,2)
2	128	12	3	2	2	2	86 (67,2)
3	93	8	3	4	4	4	69 (74,2)
4	152	12	3	3	3	3	93 (61,2)
5	63	12	2	3	3	3	28 (42,4)
6	138	12	3	4	3	3	66 (47,8)
Total	733						382 (52,1)

(EH): 2 = Bom, 3 = Ruim; (ES): 2 = Bom, 3 = Regular, 4 = Ruim; (SC): 2 = Bom, 3 = Regular, 4 = Ruim; Mo = Moda do escore predominante.

No QUADRO 2 estão resumidas as observações relativas aos procedimentos de manejo avaliados durante as visitas aos retiros, categorizadas em “sim” e “não”, em cada retiro.

QUADRO 2. Procedimentos de manejo utilizados nos sistemas de produção, antes e após a ordenha, utilizados como parâmetro de avaliação do escore de manejo para cada unidade produtora.

Procedimentos de manejo em relação aos animais (SC)	Sistemas de produção analisados					
	1	2	3	4	5	6
Utilização de cavalo para a condução dos animais	sim	não	não	sim	sim	sim
Utilização de hastes de madeira ou equivalente	não	não	sim	sim	sim	sim
Comunicação do ordenhador com os animais em alto volume	não	não	sim	sim	sim	não
Presença de aparelho sonoro na sala de ordenha	sim	sim	não	não	não	não
Número de animais excedente ao número de ordenhadeiras	não	sim	sim	não	não	não
Mais de uma pessoa no interior da sala de ordenha	não	não	sim	sim	sim	não
Presença de outros animais domésticos na sala de ordenha ou imediações	não	sim	não	sim	sim	não
Período de permanência na sala de ordenha maior que 12 minutos	não	não	sim	sim	sim	não
Período de espera de retorno ao cocho de alimentação maior que 30 minutos	sim	sim	não	sim	não	sim

Quanto aos escores, apresentados na TABELA 2 e QUADRO 2, sobre os procedimentos de higiene da vaca antes da ordenha (EH), higiene na sala de ordenha, antes e após a ordenha (ES) e manejo em relação aos animais (SC), verificou-se que em nenhum retiro foi observado o escore classificado como “ótimo”, e o retiro 3 mostrou o pior desempenho neste quesito. Dos 382 animais

com lesão de VVG a maior frequência foi verificada no retiro 3, e a menor no retiro 1. O Grau de lesão mais freqüente foi o I, com 38,9%, e a lesão de Grau III foi observada em 0,4% das vacas examinadas.

A TABELA 3 traz os dados relativos ao número de amostras positivas para *Mycoplasma* spp, *Ureaplasma diversum*, ambos ou negativas.

TABELA 3. Dados relacionados à presença de vulvovaginite e o isolamento positivo para *Mycoplasma* spp e *U. diversum*, em relação aos seis retiros testados.

Sistema de produção	Número de vacas testadas	Grau de Lesão -VVG Predominante	Amostras negativas		<i>Mycoplasma</i> spp.		<i>Ureaplasma diversum</i>		Ambos	
			n	%	n	%	n	%	n	%
1	159	1	105	14.3	18	2.5	17	2.3	19	2.6
2	128	2	57	7.8	16	2.2	27	3.7	28	3.8
3	93	3	35	4.8	9	1.2	40	5.5	9	1.2
4	152	2	60	8.2	8	1.1	65	8.9	19	2.6
5	63	1	18	2.5	7	1.0	29	4.0	9	1.2
6	138	1	105	14.3	12	1.6	12	1.6	9	1.2
Total	733		380	51.8	70	9.5	190	25.9	93	12.7

Os resultados relacionados às análises de correlação de Spearman (r), onde r varia de -1 a 1 para nível de significância de $p \leq 0,05$, para as variáveis dependentes *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM), estão demonstrados nas TABELAS 4 a 9 e nas FIGURAS 1 e 2.

TABELA 4. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM) e os graus de lesão (GL), para os seis retiros.

	Grau de lesão de vulvovaginite							
	GL1		GL2		GL3		GL4	
UM1	-0.54	(0.46) ¹	-0.77	(0.23)	-0.77	(0.23)	-0.77	(0.23)
UM2	0.27	(0.73)	0.26	(0.74)	0.26	(0.74)	-0.26	(0.74)
UM3	-0.54	(0.46)	-0.26	(0.74)	-0.26	(0.74)	0.26	(0.74)
UM4	0.82	(0.18)	0.77	(0.23)	0.77	(0.23)	0.77	(0.23)

1 – corresponde ao $p =$ valor; GL1 = Sem lesão, GL2 = Grau I, GL3 = Grau II, GL4 = Grau III.

TABELA 5. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM) e raça (RA) e forma de reposição animal (RE), para os seis retiros.

	Padrão racial				Tipo de reposição	
	RA1	RA2	RA3	RA4	RE1	RE2
UM1	0 (1) ¹	-0.77 (0.23)	-0.77 (0.23)	-0.54 (0.46)	-0.77 (0.23)	-0.77 (0.23)
UM2	0 (1)	0.77 (0.23)	0.26 (0.74)	0.82 (0.18)	0.26 (0.74)	0.77 (0.23)
UM3	-0.82 (0.18)	-0.26 (0.74)	-0.26 (0.74)	-0.54 (0.46)	-0.26 (0.74)	-0.26 (0.74)
UM4	0.82 (0.18)	0.26 (0.74)	0.77 (0.23)	0.27 (0.73)	0.77 (0.23)	0.26 (0.74)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; RA1 = Girolando 7/8, RA2 = Girolando 3/4, RA3 = Sem padrão, RA4 = Jersey; RE1 = Local, RE2 = Externo.

TABELA 6. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM) e a produção de leite (PL) e a condição reprodutiva da vaca (CV), para os seis retiros.

	Produção de leite		Condição da vaca			
	PL1	PL2	CV1	CV2	CV3	CV4
UM1	-0.77 (0.23) ¹	-0.77 (0.23)	-0.77 (0.23)	-0.82 (0.18)	-0.77 (0.23)	-0.77 (0.23)
UM2	0.77 (0.23)	0.26 (0.74)	0.26 (0.74)	0.54 (0.46)	0.26 (0.74)	0.26 (0.74)
UM3	-0.26 (0.74)	-0.26 (0.74)	-0.26 (0.74)	-0.27 (0.73)	-0.26 (0.74)	-0.26 (0.74)
UM4	0.26 (0.74)	0.77 (0.23)	0.77 (0.23)	0.54 (0.46)	0.77 (0.23)	0.77 (0.23)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; PL1 = Baixa, PL2 = Regular; CV1 = Vazia normal, CV2 = Vazia atrasada, CV3 = Vazia inseminada, CV4 = Prenhe.

TABELA 7. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM) e o escore corporal da vaca (SV), para os seis retiros.

	Escore corporal da vaca					
	SV15	SV20	SV25	SV30	SV35	SV40
UM1	0.27 (0.73) ¹	-0.26 (0.74)	-0.77 (0.23)	-0.77 (0.23)	-0.26 (0.74)	-0.77 (0.23)
UM2	-0.54 (0.46)	0.26 (0.74)	0.26 (0.74)	0.26 (0.74)	0.26 (0.74)	-0.26 (0.74)
UM3	-0.54 (0.46)	-0.77 (0.23)	-0.26 (0.74)	-0.26 (0.74)	-0.77 (0.23)	0.26 (0.74)
UM4	0.82 (0.18)	0.77 (0.23)	0.77 (0.23)	0.77 (0.23)	0.77 (0.23)	0.77 (0.23)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; SV15 = Escore 1,5, SV20 = Escore 2,0, SV25 = Escore 2,5, SV30 = Escore 3,0, SV35 = Escore 3,5, SV40 = Escore 4,0; UM1 = Positivo para *Mycoplasma* spp, UM2 = Positivo para *U. diversum*, UM3 = Positivo para *Mycoplasma* spp e *U. diversum*, UM4 = Negativo.

TABELA 8. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM) e o tratamento (TR) e o escore de higiene da sala de ordenha (ES), para os seis retiros.

	Tratamento				Higiene da sala de ordenha					
	TR1		TR2		ES2		ES3		ES4	
UM1	-0.77	(0.23) ¹	-0.54	(0.46)	-0.77	(0.23)	-0.77	(0.23)	-0.26	(0.74)
UM2	0.26	(0.74)	0.27	(0.73)	0.26	(0.74)	0.77	(0.23)	0.26	(0.74)
UM3	-0.26	(0.74)	-0.54	(0.46)	-0.26	(0.74)	-0.26	(0.74)	-0.77	(0.23)
UM4	0.77	(0.23)	0.82	(0.18)	0.77	(0.23)	0.26	(0.74)	0.77	(0.23)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; TR1= Sem tratamento, TR2 = Com tratamento; ES2 = Bom, ES3 = Regular, ES4 = Ruim.

TABELA 9. Correlação de Spearman (r) entre as variáveis dependentes *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM) e o escore do manejo (SC) e o escore de higiene pré e pós ordenha (EH), para os seis retiros.

	Escore do manejo						Escore de higiene da vaca			
	SC2		SC3		SC4		EH2		EH3	
UM1	-0.77	(0.23) ¹	-0.77	(0.23)	-0.54	(0.46)	-0.26	(0.74)	-0.77	(0.23)
UM2	0.26	(0.74)	0.26	(0.74)	0.82	(0.18)	0.26	(0.74)	0.26	(0.74)
UM3	-0.26	(0.74)	-0.26	(0.74)	-0.54	(0.46)	-0.77	(0.23)	-0.26	(0.74)
UM4	0.77	(0.23)	0.77	(0.23)	0.27	(0.73)	0.77	(0.23)	0.77	(0.23)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; SC2 = Bom, SC3 = Regular, SC4 = Ruim; EH2 = Bom, EH3 = Ruim.

Amostras positivas para *Mycoplasma* spp (UM1) e para *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* (UM3), apresentaram correlação negativa com a maioria dos fatores: negativas para lesão de vulvovaginite (GL1), lesão de vulvovaginite de Grau I (GL2) e de Grau II (GL3), raça Girolando $3/4$ (RA2), Girolando sem padrão racial definido (RA3), Jersey (RA4), reposição dos animais com produtos do próprio local (RE1) e com animais procedentes de outras propriedades (RE2), produção de leite baixa (PL1) e regular (PL2), vacas vazias (CV1), vazias atrasadas (CV2), vazias inseminadas (CV3) e prenhes (CV4), animais que não recebiam tratamento (TR1) e que recebiam tratamento (TR2), escore corporal 2,5 (SV25), 3,0 (SV30) e 3,5 (SV30), procedimentos de higiene da vaca antes da ordenha bom (EH2) e regular (EH3), procedimentos de higiene na sala antes e após a ordenha bom (ES2), regular (ES3) e ruim (ES4) e procedimentos de manejo em relação aos animais bom (SC2), regular (SC3) e ruim (SC4).

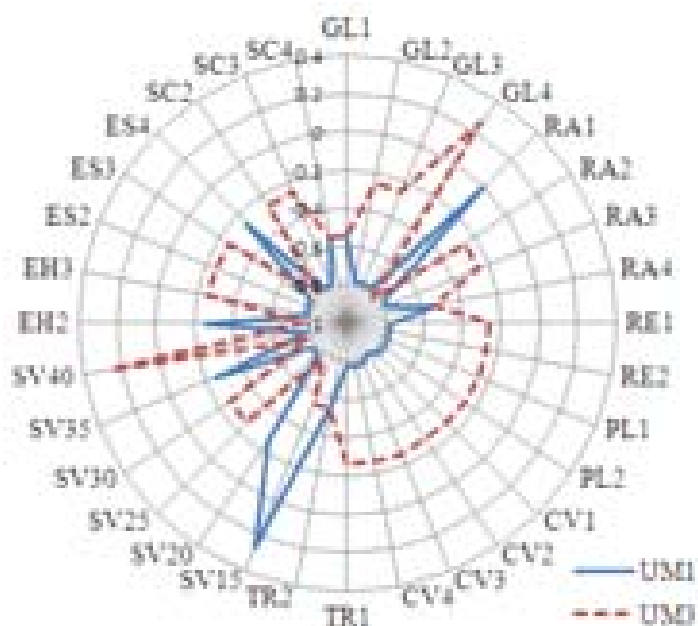


FIGURA 1. Distribuição radial dos pontos de correlação baseados nos cálculos de coeficiente de correlação de Spearman, para isolamento microbiológico das amostras testadas. *Mycoplasma* spp (UM1); *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* (UM3).

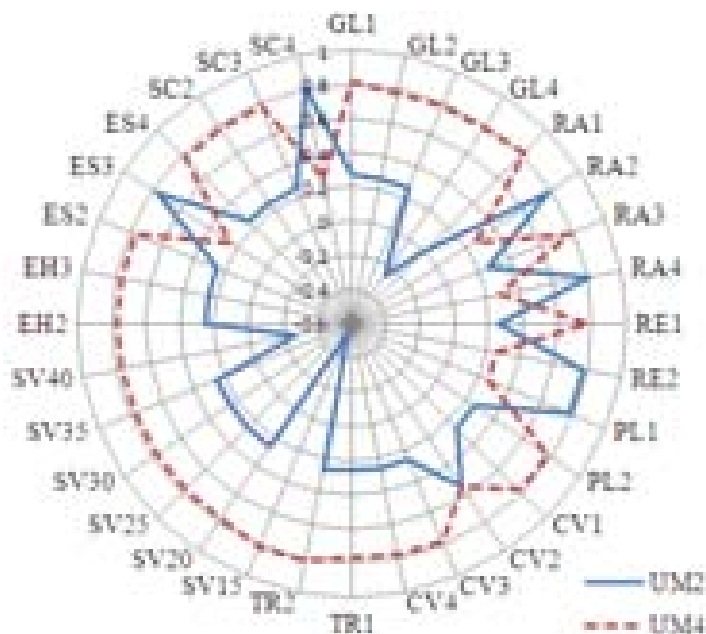


FIGURA 2. Distribuição radial dos pontos de correlação baseados nos cálculos de coeficiente de correlação de Spearman, para o isolamento microbiológico das amostras testadas. *Ureaplasma diversum* (UM2); Negativo para micoplasmas (UM4).

Legenda

GL1	Negativo para vulvovaginite
GL2	Vulvovaginite de Grau I
GL3	Vulvovaginite de Grau II
GL4	vulvovaginite de Grau III
RA1	Raça Girolando 7/8
RA2	Raça Girolanda 3/4
RA3	Girolanda sem padrão racial
RA4	Raça Jersey
RE1	Reposição com produtos locais
RE2	Reposição das vacas com produtos de outras propriedades
PL1	Produtividade de leite = Baixa
PL2	Produtividade de leite = Regular
CV1	Condição vazia normal
CV2	Condição vazia atrasada
CV3	Condição vazia inseminada
CV4	Condição prenhe
TR1	Animais sem tratamento
TR2	Animais com tratamento
SV15	Escore corporal = 1,5
SV20	Escore corporal = 2,0
SV25	Escore corporal = 2,5
SV30	Escore corporal = 3,0
SV35	Escore corporal = 3,5
SV40	Escore corporal = 4,0
EH2	Higiene antes da ordenha = Bom
EH3	Higiene antes da ordenha = Ruim
ES2	Higiene na sala de ordenha = Bom
ES3	Higiene na sala de ordenha = Regular
ES4	Procedimentos de higiene na sala de ordenha durante e após a ordenha = Ruim
SC2	Manejo = Bom
SC3	Manejo = Regular
SC4	Manejo = Ruim

Houve correlação fracamente positiva entre a ocorrência do *Mycoplasma* spp (UM1) e o escore corporal 1,5 (SV15). A ocorrência simultânea de *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM3) mostrou correlação moderadamente positiva com Grau de lesão III (GL4) e escore corporal 4,0 (SV40).

Amostras positivas para *U. diversum* tiveram correlação moderadamente positiva com a condição reprodutiva de vaca atrasada (CV2) e fortemente positiva com as raças Girolando 3/4 (RA2) e Jersey (RA4), assim como para os animais procedentes de outras propriedades (RE2), produção de leite baixa (PL1), escore do procedimento de higiene da sala de ordenha antes e após a ordenha regular (ES3) e procedimentos de manejo em relação aos animais ruim (SC4).

Houve correlação fortemente positiva ($r \geq 0,77$ e $p \leq 0,23$) entre isolamentos negativos para *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM4) com todos os graus de lesão de VVG (GL2), (GL3), (GL4), inclusive ausência destas (GL1), assim como com raça Girolando sem padrão definido (RA3), reposição com produtos locais (RE1), produção de leite regular (PL2), vacas vazias normais (CV1), inseminadas (CV3) ou prenhes (CV4), animais tratados (TR2) e não tratados (TR1), todos os escores corporais (SV15), (SV20), (SV25), (SV30), (SV35), (SV40), escore de higiene da sala de ordenha bom (ES20) ou ruim (ES4) e escore do manejo bom (SC2) ou regular (SC3).

Os isolamentos de *Mycoplasma* spp foram confirmados pela coloração de Dienes. Não houve identificação das espécies por provas bioquímicas específicas. A análise de chance de risco (OR) foi feita com os resultados das amostras que apresentaram isolamento somente de *U. diversum* ou a associação deste com o *Mycoplasma* spp. Na TABELA 10 estão as OR calculadas para amostras positivas para o agente, considerando a presença ou não de lesões de VVG, em relação aos escores de condição corporal (SV) manejo em relação aos animais (SC) e produção leite diária (PL).

TABELA 10. Estimativa de risco (OR) de acordo com a positividade para *U. diversum* em muco vulvovaginal e o escore de condição corporal (SV), escore de manejo com os animais (SC) e produção leite diária (PL) .

Variáveis	OR	IC 95%	P
SV ≤2,5	2,68*	1,95 - 3,67	0,0001
SV >2,5			
SC <3	1,28	0,94 - 1,73	0,10
SC ≥3			
PL <12L	0,30*	0,21 - 0,39	0,0001
PL ≥ 12L			

OR – Odds ratio; IC 95% - Intervalo de confiança; p - Probabilidade associada à hipótese de nulidade e * P<0,05.

Vacas com escore corporal menor ou igual a 2,5 (SV15 – SV25) tiveram 2,68 mais vezes a chance de serem positivas para *Ureaplasma diversum* e apresentarem VVG, e aquelas pertencentes aos retiros com PL abaixo de 12 litros (PL1) tiveram 0,30 vezes mais chance.

Na TABELA 11 estão as OR calculadas para amostras positivas para o agente considerando a presença ou não de lesões de VVG, em relação às raças.

TABELA 11. Estimativa de risco (OR) de acordo com a positividade para *U. diversum* em muco vulvovaginal, apresentando lesões de VVG, de acordo com as raças.

Raças	OR	IC 95%	P
RA1	0,86	0,33 - 2,23	0,77
RA2	1,50	0,82 - 2,74	0,19
RA3	2,26*	1,31 - 3,88	0,003
RS4	1,04	0,36 - 2,90	0,90

OR – Odds ratio; IC 95% - Intervalo de confiança; p - Probabilidade associada à hipótese de nulidade e * P<0,05; RA1 = Girolando 7/8, RA2 = Girolando 3/4, RA3 = Sem padrão, RA4 = Jersey.

Vacas da raça Girolando sem padrão racial (RA3) apresentaram 2,26 mais chances de serem positivas para *Ureaplasma diversum* e apresentarem VVG (P<0.05), provavelmente por estarem em maior número.

TABELA 12. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e a raça (RA) e o tipo de reposição animal (RE), para os seis retiros.

	Padrão racial								Tipo de reposição			
	RA1		RA2		RA3		RA4		RE1		RE2	
GL1	0.83	(0.17) ¹	0.74	(0.26)	0.95	(0.05)	0.78	(0.22)	0.95	(0.05)	0.74	(0.26)
GL2	0.63	(0.37)	0.8	(0.2)	1	(<,0001)	0.74	(0.26)	1	(<,0001)	0.8	(0.2)
GL3	0.63	(0.37)	0.8	(0.2)	1	(<,0001)	0.74	(0.26)	1	(<,0001)	0.8	(0.2)
GL4	0.32	(0.68)	0.4	(0.6)	0.8	(0.2)	0.21	(0.79)	0.8	(0.2)	0.4	(0.6)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; RA1 = Girolando 7/8, RA2 = Girolando 3/4, RA3 = Sem padrão, RA4 = Jersey; RE1 = Local, RE2 = Externo.

TABELA 13. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e a condição reprodutiva da vaca (CV), para os seis retiros.

	Condição reprodutiva da vaca							
	CV1		CV2		CV3		CV4	
GL1	0.95	(0.05) ¹	0.89	(0.11)	0.95	(0.05)	0.95	(0.05)
GL2	1	(<,0001)	0.95	(0.05)	1	(<,0001)	1	(<,0001)
GL3	1	(<,0001)	0.95	(0.05)	1	(<,0001)	1	(<,0001)
GL4	0.8	(0.2)	0.63	(0.37)	0.8	(0.2)	0.8	(0.2)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; CV1 = Vazia normal, CV2 = Vazia atrasada, CV3 = Vazia inseminada, CV4 = Prenhe.

TABELA 14. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e o tratamento (TR) e a produtividade (PL), para os seis retiros.

	Tratamento				Produção de leite			
	TR1		TR2		PL1		PL2	
GL1	0.95	(0.05) ¹	1	(<,0001)	0.74	(0.26)	0.95	(0.05)
GL2	1	(<,0001)	0.95	(0.05)	0.8	(0.2)	1	(<,0001)
GL3	1	(<,0001)	0.95	(0.05)	0.8	(0.2)	1	(<,0001)
GL4	0.8	(0.2)	0.63	(0.37)	0.4	(0.6)	0.8	(0.2)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; TR1 = Sem tratamento, TR2 = Com tratamento; PL1 = Baixa, PL2 = Regular.

TABELA 15. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e o escore corporal das vacas (SV), para os seis retiros.

	Escore corporal da vaca											
	SV15		SV20		SV25		SV30		SV35		SV40	
GL1	0.5	(0.5) ¹	0.95	(0.05)	0.95	(0.05)	0.95	(0.05)	0.95	(0.05)	0.63	(0.37)
GL2	0.32	(0.68)	0.8	(0.2)	1	(<,0001)	1	(<,0001)	0.8	(0.2)	0.8	(0.2)
GL3	0.32	(0.68)	0.8	(0.2)	1	(<,0001)	1	(<,0001)	0.8	(0.2)	0.8	(0.2)
GL4	0.32	(0.68)	0.4	(0.6)	0.8	(0.2)	0.8	(0.2)	0.4	(0.6)	1	(<,0001)

1 – Corresponde ao $p =$ valor; SV15 = Escore 1,5, SV20 = Escore 2,0, SV25 = Escore 2,5, SV30 = Escore 3,0, SV35 = Escore 3,5, SV40 = Escore 4,0.

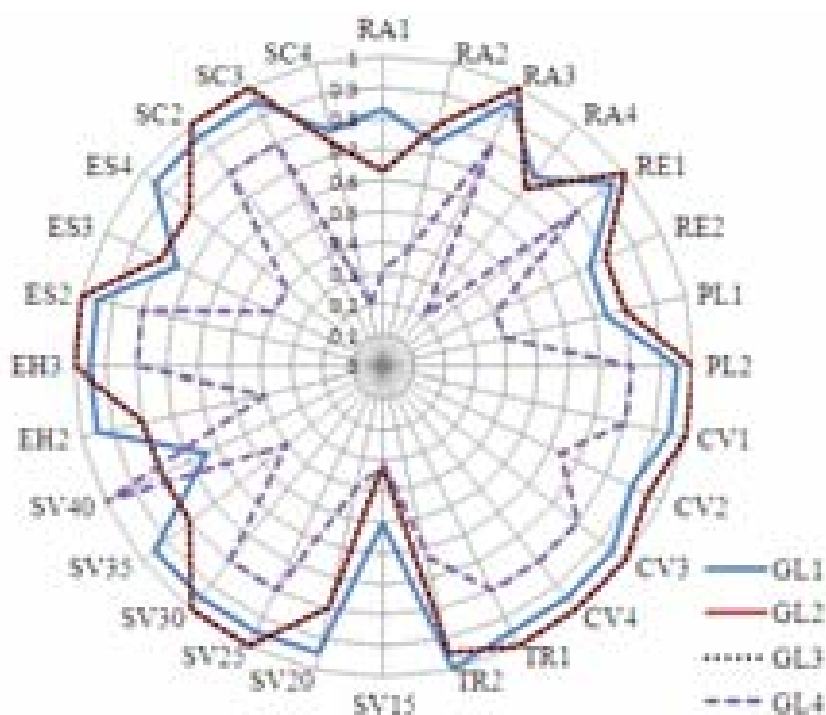


FIGURA 3. Distribuição radial dos pontos de correlação baseados nos cálculos de coeficiente de correlação de Spearman, para os Graus da lesão de vulvovaginite e os outros parâmetros estudados. Negativo para lesão (GL1); Lesão de Grau I (GL2), Lesão de Grau II (GL3), Lesão de Grau III (GL4).

Legenda

RA1	Raça Girolando 7/8	SV15	Escore corporal = 1,5
RA2	Raça Girolanda ¾	SV20	Escore corporal = 2,0
RA3	Girolanda sem padrão racial	SV25	Escore corporal = 2,5
RA4	Raça Jersey	SV30	Escore corporal = 3,0
RE1	Reposição com produtos locais	SV35	Escore corporal = 3,5
RE2	Reposição das vacas com produtos de outras propriedades	SV40	Escore corporal = 4,0
PL1	Produtividade de leite = Baixa	EH2	Higiene antes da ordenha = Bom
PL2	Produtividade de leite = Regular	EH3	Higiene antes da ordenha = Ruim
CV1	Condição vazia normal	ES2	Higiene na sala de ordenha = Bom
CV2	Condição vazia atrasada	ES3	Higiene na sala de ordenha = Regular
CV3	Condição vazia inseminada	ES4	Procedimentos de higiene na sala de ordenha durante e após a ordenha = Ruim
CV4	Condição prenhe	SC2	Manejo = Bom
TR1	Animais sem tratamento	SC3	Manejo = Regular
TR2	Animais com tratamento	SC4	Manejo = Ruim

TABELA 16. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e o escore de higiene da vaca (EH) e o escore de higiene da sala de ordenha (ES), para os seis retiros.

	Escore de higiene da vaca		Escore de higiene da sala de ordenha		
	EH2	EH3	ES2	ES3	ES4
GL1	0.95 (0.05) ¹	0.95 (0.05)	0.95 (0.05)	0.74 (0.26)	0.95 (0.05)
GL2	0.80 (0.20)	1.00 (<,0001)	1.00 (<,0001)	0.80 (0.20)	0.80 (0.20)
GL3	0.80 (0.20)	1.00 (<,0001)	1.00 (<,0001)	0.80 (0.20)	0.80 (0.20)
GL4	0.40 (0.60)	0.80 (0.20)	0.80 (0.20)	0.40 (0.60)	0.40 (0.60)

1 – Corresponde ao p = valor; EH2 = Bom, EH3 = Ruim; ES2 = Bom, ES3 = Regular, ES4 = Ruim.

TABELA 17. Correlação (r) de Spearman comparando o Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL) e o escore do manejo em relação aos animais (SC), para os seis retiros.

	Escore do manejo		
	SC2	SC3	SC4
GL1	0.95 (0.05) ¹	0.95 (0.05)	0.78 (0.22)
GL2	1.00 (<,0001)	1.00 (<,0001)	0.74 (0.26)
GL3	1.00 (<,0001)	1.00 (<,0001)	0.74 (0.26)
GL4	0.80 (0.20)	0.80 (0.20)	0.21 (0.79)

1 – Corresponde ao p = valor; SC2 = Bom, SC3 = Regular, SC4 = Ruim.

Os resultados presentes nas TABELAS 12 a 17 e na FIGURA 3 mostram que os dados relacionados às lesões de Grau I e II (GL2 e GL3), apresentaram os mesmos pontos de correlação. Estes foram significativamente positivos com os animais da raça Girolando sem padrão definido (RA3), oriundos de reposição do próprio local (RE1), com produção de leite regular (PL2), com todas as condições reprodutivas (CV1, CV2, CV3 e CV4), tanto com animais tratados (TR2), quanto não tratados (TR1), os escores corporais 2,5 (SV25) e 3,0 (SV30), com higiene das vacas antes da ordenha ruim (EH3), escore de higiene da sala de ordenha bom (ES2) e escore do manejo bom (SC2) ou regular (SC3). Enquanto que a lesão de Grau III teve correlação fortemente positiva com os Girolando sem padrão racial definido (RA3), repostos de produtos locais (RE1), com produção de leite regular (PL2), condição reprodutiva vazias normais (CV1), vazias inseminadas (CV3), prenhes (CV4), que não estavam recebendo tratamento (TR1), com os escores corporais entre 2,5 (SV25) e 3,0 (SV30), escore de higiene da vaca ruim (EH3), higiene da sala de ordenha bom (ES2) e escore do manejo bom (SC2) a regular (SC3). Este tipo de lesão apresentou correlação significativamente positiva para o escore corporal 4,0.

A freqüência de amostras sorológicas positivas para *Leptospira interrogans* (14 sorovares) e *Neospora caninum* estão na TABELA 18.

TABELA 18. Freqüência de sorologia positiva para *Neospora caninum* e 14 sorovares da *Leptospira interrogans*, feito por detecção sorológica de anticorpos específicos, do rebanho pertencente aos seis retiros testados.

Testes sorológicos	Positivos	
	n *	%
<i>Neospora caninum</i>	4	2.0
<i>Lepstospira interrogans australis</i>	2	1.0
<i>Lepstospira interrogans Bratislava</i>	3	1.5
<i>Lepstospira interrogans autumnalis</i>	12	6.1
<i>Lepstospira interrogans castellonis</i>	108	55.1
<i>Lepstospira interrogans grippotyphosa</i>	4	2.0
<i>Lepstospira interrogans hebdomalis</i>	11	5.6
<i>Lepstospira interrogans copenhageni</i>	1	0.5
<i>Lepstospira interrogans icterohaemorrhagiae</i>	9	4.6
<i>Lepstospira interrogans pomona</i>	27	13.8
<i>Lepstospira interrogans pyrogenes</i>	4	2.0
<i>Lepstospira interrogans hardjo</i>	140	71.4
<i>Lepstospira interrogans wolffi</i>	112	57.1
<i>Lepstospira interrogans shermani</i>	8	4.1
<i>Lepstospira interrogans sentot</i>	6	3.1

* Amostras positivas por cada sorovar testado

Das 196 amostras testadas, 2,0% (4) foram positivas para *Neospora caninum* e 80% (156) para *Leptospira interrogans*. Dentre os sorovares testados, os de maior ocorrência foram os *Lepstospira interrogans castellonis* (51,1%), *Lepstospira interrogans hardjo* (71%) e *Lepstospira interrogans wolffi* (57,1%), e o sorovar menos freqüente foi *Lepstospira interrogans copenhageni* (0,5%).

Conforme pode ser observado na FIGURA 4, entre os casos positivos para *Mycoplasma spp* (UM1), 12,9% das amostras eram provenientes de vacas também positivas para *Leptospira interrogans* e 1,4% para *Neospora caninum*. Dos animais positivos para *Ureaplasma diversum*,(UM2) 15,8% dos casos foram positivos para *Leptospira interrogans* e nenhum para *Neospora caninum*, enquanto que dentre as amostras de muco vulvovaginal positivas para ambos os agentes (UM3), 11,8% eram de fêmeas positivas para *Leptospira interrogans* e 1,1% para *Neospora caninum*.



FIGURA 4. Frequência dos resultados dos testes sorológicos para *Neospora caninum* e *Leptospira interrogans* associado aos resultados para *Mycoplasma* spp (UM1); *Ureaplasma diversum* (UM2); *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* (UM3); Negativo para micoplasmas (UM4), realizado nas vacas de produção dos seis reiros.

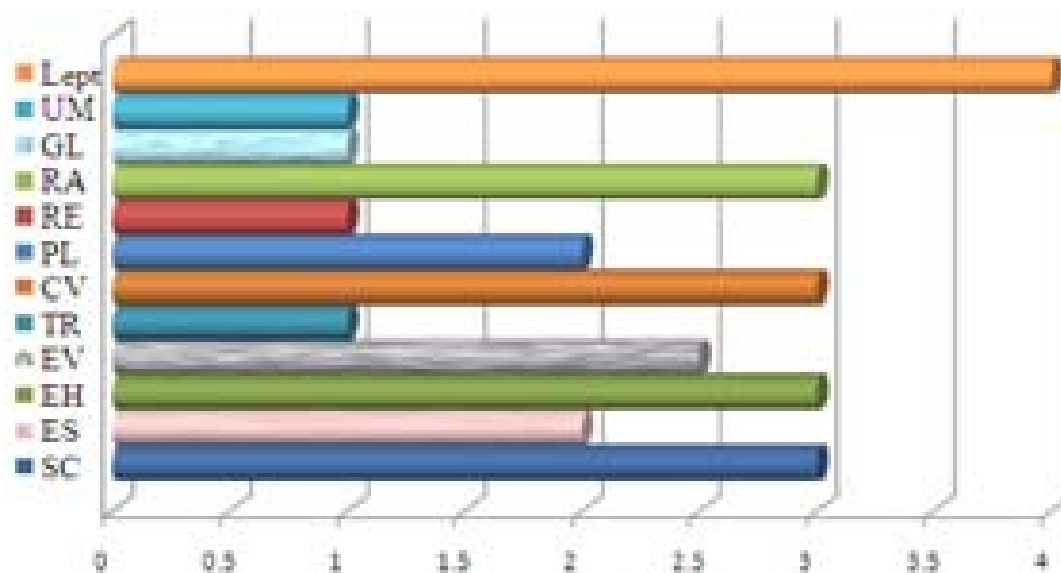


FIGURA 5. Características mais frequentes dos animais soropositivos para *Leptospira* onde foram estimado a Moda dos animais com o isolamento para *Mycoplasma* spp e *U. diversum* (UM), Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL), padrão racial (RA), reposição animal (RE), produtividade (PL), condição da vaca (CV), tratamento (TR), escore corporal (EV), com o escore do ordenhador (EH), o escore de higiene da sala de ordenha (ES) e o escore do manejo (SC) em relação aos animais pertencentes aos seis sistemas de produção avaliados.

Na FIGURA 5 estão distribuídos os cálculos de moda pra cada um dos fatores analisados nos retiros, levando em consideração a positividade para *Leptospira interrogans*. Foi verificado que ocorreu maior freqüência de 4 sorovares positivos por animal, os sororeagentes foram mais freqüentes em animais positivos para *Mycoplasma spp* (UM1), sem lesões para VVG de Grau I (GL1), da raça Girolando sem padrão definido (RA3), pertencentes aos retiros nos quais a forma de reposição é própria (RE1), produção de leite regular (PL2), vazias e inseminadas (CV3), não tratadas (TR1), com escore corporal 2,5 (EV25), pertencentes aos retiros com escore de higiene da ordenha ruim (EH3), escore de higiene da sala de ordenha bom (ES2) e escore do manejo regular (SC3).

Os resultados relacionados às análises de correlação de Pearson (r), onde r varia de -1 a 1 para nível de significância de $p \leq 0,05$, para as variáveis dependentes *Neospora caninum* e *Leptospira interrogans*, estão demonstrados na TABELA 19.

TABELA 19. Correlação (r) de Pearson comparando o diagnóstico sorológico positivo para *Neospora caninum* e *Leptospira interrogans* com o isolamento para *Mycoplasma spp* e *U. diversum* (UM), Grau de lesão relacionado à vulvovaginite (GL), padrão racial (RA), reposição animal (RE), produtividade (PL), condição da vaca (CV), quimioterapia (TR), escore corporal (EV), com o escore do ordenhador (EH), o escore de higiene da sala de ordenha (ES) e o escore do manejo (SC), para os seis retiros.

	UM	GL	RA	RE	PL	CV	TR	EV	EH	ES	SC
	0.03	-0.08	-0.02	-0.09	0.09	-0.06	0.10	-0.10	-0.10	0.01	-0.03
NEO	(0.65) ¹	(0.28)	(0.79)	(0.23)	(0.23)	(0.41)	(0.17)	(0.19)	(0.19)	(0.83)	(0.63)
	-0.06	0.05	-0.04	0.03	-0.03	-0.007	-0.07	0.14	0.04	0.04	0.01
LEPT	(0.44)	(0.52)	(0.60)	(0.66)	(0.66)	(0.92)	(0.32)	(0.07)	(0.57)	(0.60)	(0.83)

1 – Corresponde ao $p =$ valor

Não houve correlação significativa entre a sorologia positiva para *Neospora caninum* e *Leptospira interrogans* e nenhum dos fatores avaliados. A maioria das amostras positivas para *Leptospira interrogans*, ou seja, 51 reações ocorreram de forma simultânea para quatro sorovares testados.

4. DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com base na hipótese de que, dentro de um sistema de produção de leite, a vaca em lactação é aquela que estará mais exposta ao efeito de microrganismos patogênicos. As frequências de amostras positivas para *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* verificadas no presente estudo (9,5% e 25,9%, respectivamente) são similares àquelas previamente reportadas, tanto no Brasil quanto em outros países. MULIRA et al. (1992), no Canadá, obtiveram frequência de 7,5 e 43,3% para *Mycoplasma* spp e *U. diversum*, respectivamente, avaliando vacas de leite com e sem lesões de VVG, e Le GRAND et al. (1995), na França, verificaram 40% de amostras positivas para *U. diversum*, também em vacas de leite, porém sem relação com a presença ou não de lesões de VVG. No Brasil, CARDOSO et al. (2000) fizeram o primeiro relato sobre a ocorrência do *U. diversum* em material oriundo de fêmeas com problemas reprodutivos e lesões de VVG, com frequência de 52,6 e 23,7% em vacas Holandesas e Jersey, respectivamente. PETIT et al. (2008), estudando a prevalência de *Mollicutes* em 196 sistemas de produção de leite na Áustria, verificaram que 2,3% das amostras de muco vaginal eram positivas para *M. bovigenitalium* e 35,5% para *U. diversum*, concluindo que este último agente pode estar associado com vaginite. A utilização de técnicas de biologia molecular mostraria maior número de amostras positivas, como demonstrado por BUZINHANI et al., (2007), que verificaram 12,5% a mais de amostras de muco vulvovaginal positivas para *Ureaplasma diversum* processadas pela PCR em tubo único em relação ao cultivo em caldo e ágar. Assim, pode-se inferir que, dentre os animais avaliados, um número maior de vacas que o aqui descrito poderiam ser portadoras destes agentes. Em relação às frequências obtidas no presente estudo, a importância está no fato de demonstrar a presença desses agentes em todos os retiros avaliados.

Para PETIT et al. (2008), o *U. diversum* pode colonizar a mucosa vulvar e vaginal exercendo um papel comensal, e sua importância como agente patogênico e causador de distúrbios reprodutivos deve ser discutida, visto que a bactéria também pode ser isolada de muco vaginal de vacas sem problemas clínicos reprodutivos. Para os autores, o isolamento positivo de *Mollicutes* de

material cervical seria mais efetivo na indicação do seu envolvimento no baixo desempenho reprodutivo de vacas leiteiras. No entanto LYSNYANSKY et al. (2009) obtiveram número substancial de isolamentos de *M. bovigenitalium* e *M. canadense* em amostras obtidas durante surtos de vulvovaginite em vacas leiteiras, reforçando a hipótese de seu envolvimento na ocorrência da VVG.

Os resultados positivos para *Mycoplasma* spp e para ambos os agentes apresentaram correlação negativa ou fracamente positiva com a maioria dos fatores avaliados. AL-MOMANI et al. (2008) e LEÓN et al. (1995) estudando a correlação entre ocorrência de *Mycoplasma agalactiae* e fatores de risco para mastite, verificaram também correlação negativa, e justificaram o achado pela presença de anticorpos protetores detectados nos rebanhos soropositivos. FOX et al. (2003) relataram que as baixas correlações devem-se à característica epidemiológica do *Mycoplasma* spp, em apresentar inicialmente alto potencial de propagação, atingindo animais de todas as categorias, e posterior redução até o seu desaparecimento do órgão afetado, o que torna o descarte dos animais positivos como a ferramenta mais efetiva de controle.

Em relação aos fatores produção de leite e condição reprodutiva, verificou-se a correlação entre positividade para *Ureaplasma diversum*, menor produção de leite e condição reprodutiva deficiente - CV2. Para GÁBOR et al. (2008), animais de alta produção leiteira apresentam desempenho reprodutivo insatisfatório por estarem permanentemente sob condições de estresse, mas os dados aqui apresentados mostram que, mesmo com baixa produção de leite, as vacas estavam vazias e atrasadas, ou seja, sem o efeito deletério da maior produção. Estes animais eram positivos para o agente e apresentavam baixo desempenho reprodutivo, sugerindo ser a queda de produção uma consequência do distúrbio reprodutivo (GRÖHN & RAJALA-SCHULTZ, 2000).

TILLARD et al. (2008) apontam a produção de leite abaixo de 23 ou acima de 27 kg/L/dia e a perda de condição corporal maior que 1,5 durante os primeiros 100 dias de lactação como fatores importantes no baixo desempenho ao primeiro serviço. Os dados apresentados nas TABELAS 6 e 7 mostram maior chance de risco de positividade para *U. diversum* nas vacas com produção abaixo de 12litros/dia, e escores de condição corporal iguais ou superiores a 2,5.

GAMBARINI et al. (2009) verificaram correlação entre a lesão de Grau II e amostras positivas para *Mycoplasma* spp e *U. diversum*, ocorrendo simultaneamente. Resultado inverso ao observado nos casos em que foi possível isolar apenas um dos agentes. SANDERSON et al. (2000) não obtiveram associação entre infecções por *U. diversum* e a presença de lesões granulomatosas na mucosa vaginal, e argumentaram que, por terem verificado apenas lesões brandas, não foi possível confrontar os achados com a ocorrência de ureaplamose. OLIVEIRA FILHO et al. (2005), trabalhando com vacas leiteiras repetidoras de estro e utilizando o mesmo critério aqui descrito para avaliação das lesões de VVG, verificaram predomínio da lesão de Grau I, presente em mais de 50% dos animais avaliados, e maior número de amostras positivas para *U. diversum* relacionadas a este grau.

GAMBARINI et al. (2009), estudando a ocorrência de micoplasmose genital em novilhas de corte, verificaram predomínio da lesão de Grau II, também associado ao maior número de animais positivos para *U. diversum*. Este perfil de graus de lesão caracteriza a forma crônica da vulvovaginite granular (SANDERSON et al., 2000; GAMBARINI et al., 2009) e pode estar relacionado ao manejo da vaca em lactação, pelo maior contato entre elas durante os períodos de ordenha, já que o hábito de lamber e cheirar a genitália externa de outras fêmeas pode favorecer a disseminação do agente. HUSTED (2003), avaliando o conteúdo vaginal de 55 vacas com vaginite clínica, não obteve isolamento positivo para *Mollicutes*, atribuindo este fato às pequenas quantidades de bactérias presentes em amostras colhidas com o auxílio de zaragatoas, prejudicando o processo de cultivo, mesmo nos meios específicos.

A redução da severidade das lesões confirma os estudos achados de DOIG et al. (1979), que verificaram a ausência de descarga purulenta e o declínio gradual tanto da hiperemia quanto das formações granulares, com a cronicidade da infecção. A ausência de correlação entre o isolamento de *U. diversum* e a presença de lesões de VVG pode estar relacionada com a virulência do agente (CARDOSO et al., 2000; SPERGSER et al., 2002).

Em relação ao padrão racial, a correlação positiva para Girolando 3/4 e Jersey é corroborada por LEÓN et al. (1995), que identificaram a raça como um fator de risco associado à infecção por *Ureaplasma diversum*, relatando que

vacas Jersey tiveram 1,95 vezes mais risco que vacas Holstein de estarem infectadas por este agente. Resultado semelhante foi obtido por BEY (2006), que informa sobre o maior risco de ocorrência do *U. diversum* em animais da raça Jersey, quando comparados com a raça holandesa. CARDOSO et al. (2000) relatam maior freqüência de isolamento do *U. diversum* nas amostras obtidas de fêmeas Nelore em comparação com a raça Jersey, e maior para esta última em relação à raça Holandesa, apontando ainda maior susceptibilidade para os animais Nelore. Por outro lado, a chance de risco maior para os animais sem padrão racial (RA3), detectada neste estudo, pode ser explicada por ser esta a categoria animal mais freqüente entre os animais testados (39,1%).

De acordo com os dados expostos na TABELA 5, verifica-se que essa correlação positiva entre a presença do *U. diversum* no muco vulvovaginal e a raça predominante foi observada nos retiros nos quais a forma de reposição de animais é externa (RE2), corroborando a afirmativa de COENTRÃO et al. (2008) sobre o aumento do risco para as doenças do sistema reprodutivo quando este tipo de reposição é utilizado.

A correlação entre a ocorrência do *U. diversum* e o escore dos procedimentos de manejo ruim (SC4) confirmam as citações de ANDRADE et al. (2005), que identificaram deficiências no manejo em relação aos animais de propriedades da bacia leiteira de Goiânia. BLUM et al. (2007) também discutem o estresse de manejo como um fator predisponente para a ocorrência de patologias do sistema reprodutivo aos animais. Os autores afirmam que a aglomeração de rebanhos ou animais é uma das formas mais propícias ao estresse e à propagação de microrganismos. Este é outro elemento relacionada ao escore de ordenhador “ruim”, pois o mesmo mantém os animais aglomerados por tempo além do necessário. Ainda nesta observação, AL-MOMANI et al. (2008) ressaltam a importância para o risco de transmissão de doenças pelas mãos mal higienizadas do ordenhador. Neste mesmo contexto, COENTRÃO et al. (2008) alertam para os erros cometidos por ordenhadores mal preparados que utilizam os sistemas de ordenha de forma inadequada ou não efetuam a limpeza dos equipamentos da forma ideal, predispondo os animais às lesões e riscos para as infecções.

A frequência de fatores estressores nos sistemas de produção são responsabilizados pela predisposição biológica para a ocorrência de doenças no rebanho. Agentes estressores de manejo e também ambientais parecem estar envolvidos na manutenção e disseminação de doenças nos sistemas de produção de leite, já que esta condição favorece a imunossupressão (KEYSERLINGK et al., 2009; MOBERG, 1975). O estresse fisiológico é a condição na qual a homeostasia sofre alterações significativas, e o animal deve ser considerado sob condições estressantes quando não consegue promover ajustes fisiológicos e/ou comportamentais na presença do estressor. A lactação em si já compreende uma situação estressante e pode interferir no eixo hipófise-adrenal, promovendo elevação das concentrações circulantes de glicocorticóides, conhecidos agentes imunossupressores (MADSEN et al., 2008).

MELO et al. (2006), estudando a prevalência de animais soropositivos para *Neospora caninum* relataram variação de 14 a 83% para bovinos de leite na microregião de Goiânia. SILVA et al. (2008) verificaram associação positiva entre a soropositividade para o *Neospora caninum* e problemas reprodutivos tais como abortamento em vacas de aptidão leiteira, em Pernambuco. O pequeno número de animais positivos para *Neospora caninum* mostra que este não é um grave problema presente no rebanho estudado.

As amostras positivas para *Leptospira interrogans* não apresentaram correlação com os outros fatores estudados, embora os sorovares *hardjo* e *wolffi* tenham sido os mais frequentes, ocorrendo principalmente em animais negativos para *U. diversum*. DEL FAVA et al., (2003) descrevem que o sorovar *hardjo* é o mais importante causador de perdas reprodutivas entre os bovinos, entretanto ANDERSON (2007) afirma que este sorovar é o mais freqüente em bovinos, porém os animais tendem a hospedá-lo por tempo indeterminado, sem demonstrar conseqüências consideráveis.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- ✓ Todos os retiros foram considerados positivos para a presença de *Mollicutes* - *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum*, nas vacas em lactação;
- ✓ foi possível estabelecer a associação entre a ocorrência desses *Mollicutes* e fatores relacionados ao animal, especialmente com a presença de VVG de grau leve, raça sem padrão definido, animais repostos a partir do rebanho e escores de condição corporal maior ou igual a 2,5;
- ✓ o escore de higiene do ordenhador foi o fator relacionado ao meio ambiente que apresentou maior associação com a presença de *Mollicutes* nos animais estudados;
- ✓ não há associação entre a presença de *Mollicutes* e soropositividade para *Leptospira interrogans* e *Neospora caninum*;
- ✓ *Mycoplasma* spp e especialmente *Ureaplasma diversum* devem ser considerados como agentes envolvidos no baixo desempenho reprodutivo de vacas em lactação.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-MOMANI, W.; NICHOLAS, R.A.J.; ABO-SHEHADA, M.N. Risk factors associated with *Mycoplasma agalactiae* infection of small ruminants in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine*. n.83, p.1–10, 2008.
2. ÁLVAREZ-GARCIA, G.; PEREIRA-BUENO, J.; GÓMES-BAUTISTA, M.; ORTEGA-MORA, L.M. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Veterinary Parasitology*, v.107, n.1-2, p.15-27, 2002.
3. ANDERSON, M.L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology*, London. n.68, p.474–486, 2007.
4. ANDRADE, J.R.A.; SILVA, N.; SILVEIRA, W.; TEIXEIRA, M.C.C. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Minas Gerais. n.57, 2005. 6p.
5. BEY, I. *Les ureaplasmes en pathologie bovine: Epidemiologie, diagnostic et mesures de controle*. Universite Claude-Bernard. Lyon. França. [THESE]. v.I, n.19, 2006. 90 p.
6. BLAS, N.; ORTEGA, C.; FRANKENA, K. et al. *Win Episcopo 2.0*. Zaragoza: CLIVE, 2000. Disponível em: <<http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscopo>>. Acessado em: 12 de novembro de 2009.
7. BLUM, S.A.; MAZUZ, M.B.; BRENNER, J.C.; FRIEDGUT, O.C.; STRAM, Y.C.; KOREN, O.D.; GOSHEN, T.D.; ELAD, D. Sample-based assessment of the microbial etiology of bovine necrotic vulvovaginitis. *Theriogenology*. v.68, p.290–293, 2007.
8. BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L.W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.4, p.848-854, 2005.
9. 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*, Minas Gerais. v.59, n.6, p.1368-1375, 2007.
10. CARDOSO, M.V.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L.M.P.S; TEIXEIRA, S.R.; GENOVEZ, M.É.. *Ureaplasma diversum* and reproductive disorder in Brazilian

- cows and heifers; first report. *Animal Reproduction Science*, London. v.3-4, n.1, p.137-143, 2000.
11. CARDOSO, M.V.; TEIXEIRA, S.R.; MIYASHIRO, S.; VASCONCELLOS, S.A.; REGORY, L.; GENOVEZ, M.E. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e pcr para detecção de *mycoplasma* e *ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e central de inseminação artificial. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. v.73, n.1, p.33-40, 2006.
 12. CASTRO, V. *Estudo da soroprevalência da leptospirose bovina em ocorrências em idade reprodutiva no Estado de São Paulo, Brasil*. Universidade de São Paulo, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Dissertação [Mestrado]. 2006. 104 p.
 13. CERDÁ, R.; XAVIER, J.; SANSALONE, P.; SOTA, R.L.; ROSENBUSH, R. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* a partir de un brote de mastitis bovina en una vaquería de la provincia de Buenos Aires. Primera comunicación en la República Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, Argentina. n.42, p.7-11, 2000.
 14. CHEŁMONSKA-SOYTA, A.; KATSKA, L.; KURPISZ, M.; STEFANIAK, T.; ZIMECKI, M. The effect of *Ureaplasma diversum* activated mononuclear leukocytes on the development and interferon- production by bovine IVF-derived embryos. *Journal of Reproductive Immunology* n.51, p.145–158. 2001.
 15. COENTRÃO, C.M.; SOUZA, G.N.; BRITO, J.R.F.; PAIVA E BRITO, M.A.V.; LILENBAUM, W. Fatores de risco para mastite subclínica em vacas leiteiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Minas Gerais. v. 60, n.2, p.283-288, 2008.
 16. COSTA, R.P.; SCHROEDER, I.; SCHROEDER, J.T.; CLAUDIO, D. *Modelo de custo de produção em um sistema integrado de criação e ordenha de leite A*. XXV Encontro Nacional de Engenharia de Produção – Porto Alegre, RS, Brasil, 29 out a 01 de nov de 2005 ENEGEP. 2005.
 17. CORDEIRO, R. O mito da doença rara. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, São Paulo. v.8, n.2, p.111-116, 2005.
 18. DEL FAVA, C.; ARCARO, J.R.P.; POZZI, C.R.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; PITUCO, E.M.; STEFANO, E.; OKUDA, L.H.; VASCONCELLOS, S.A. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semintensivo. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. v.70, n.1, p.25-33, 2003.
 19. DOIG, P.A.; RUHNKE, H.L.; PALMER, N.C. Bovine Granular Vulvitis Associated with *Ureaplasma* Infection *The Canadian Veterinary Journal*. v.20, n.4, 1979.

20. EPI INFO. *Epidemiology Program Office, Versão 6.0.4*. Mailstop K74. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta. Novembro. 2001. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/EI6dnjp.htm> >
21. FERNANDES, E.N.; BRESSAN, M.; VERNEQUE, R.S. Zoneamento da pecuária leiteira da região sul do Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria. ISSN 0103-8478. v.34, n.2, p.485-491, 2004.
22. FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; MICKELSON, A.; BRITTEN, A. Bulk Tank Milk Analysis: Factors Associated with Appearance of *Mycoplasma* sp. in Milk. *Journal of Veterinary Medical – B*, Washington. n.50, p.235–240, 2003.
23. GÁBOR, G.; TÓTH, F.; ÓSVARI, L.; ABONYI-TÓTH, Zs.; SASSER, R.G. Factors Influencing Pregnancy Rate and Late Embryonic Loss in Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, Moscow. n.43, p.53–58, 2008.
24. GRÖHN, Y.T.; RAJALA-SCHULTZ, P.J. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, London. p.605–614, 2000.
25. 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*, Netherlands. n.41, p.1421–1426, 2009.
26. GIVENS, M.D. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. *Theriogenology*, v.66, n.3, p.648-54, 2006.
27. HUSTED, J.R. *Bacterial and fungal organisms in the vagina of normal cows and cows with vaginitis*. Texas A&M University: Veterinary Microbiology. [Thesis]. 2003. 29p.
28. JULIANO, R.S.; CHAVES, N.S.T.; SANTOS, C.A.; RAMOS, L.S.; SANTOS, H.Q.; MEIRELES, L.R.; GOTTSCHALK, S.R.; CORRÊA FILHO, A.C. Prevalência e aspectos epidemiológicos da leptospirose bovina em rebanho leiteiro na microrregião de Goiânia – Go. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.30, n.5, p. 857-862, 2000.
29. JUNQUEIRA, J.R.C., FREITAS, J.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. *Ciências Agrárias*, Londrina. v.27, N.3, P.471-480, 2006.

30. KEYSERLINGK, M.A.G VON; RUSHEN, J.; PASSILLÉ, A.M.DE; WEARY, D.M. The welfare of dairy cattle - Key concepts and the role of science. *Journal of Dairy Science*, USA. n.92, p.4101-4111, 2009.
31. KRUG, E.E.B. *Estudo para identificação de benchmarking em sistemas de produção de leite no Rio Grande do Sul*. Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Faculdade de Administração. Dissertação [Mestrado]. Porto Alegre. 2001. p.194.
32. LANGFORD, E.V. *Mycoplasma* species recovered from the reproductive tracts of western Canadian cows. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, Canadá. ISSN: 0008-4050. n.39, p.133-138, 1975.
33. LEÓN, B. A.; CAMPOS, E.; BOLAÑOS, H.; CABALLERO, M. Risk factors for *Ureaplasma diversum* infection in cattle in a tropical environment. *Revista de Biología Tropical*, San José. v.43, n.1-3, p.21-25, 1995.
34. LE GRAND, D.; POUMARAT, F.; MARTEL, J.L. Infectious genital disease by *Ureaplasma diversum*, investigations on bovine in France. *Veterinary Research*, USA. v.26, n.1, p.11-20, 1995.
35. LYSNYANSKY, I., BRENNER, J., ALPERT, N., BENJAMIN, A., BERNSTEIN, M., ELAD, D., BLUM, S., FRIEDGUT, O., ROTENBERG, D. Identification of *Mycoplasma bovigenitalium* and *Mycoplasma canadense* from outbreaks of granulopapular vulvovaginitis in dairy cattle in Israel. *Veterinary Record*, London. n.165, p. 319-322, 2009.
36. MADSEN, M.L.; PUTTAMREDDY, S.; THACKER, E.L.; CARRUTHERS, M.D.; F.; MINION, C. Transcriptome Changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during Infection. *Infection and immunity*. v.76, n.2, p.658–663, 2008.
37. MASSUQUETO, S.; ALMEIDA, R.; SEGUI, M.S.; COELI, C.R.V.R.; PEREIRA, I.R.; GREBORI, A. Acompanhamento médico veterinário de vacas leiteiras de elevada produção, das raças holandesa preta e branca, vermelha e branca e pardo-suíça, recém-paridas. *Revista Acadêmica*, Curitiba. v.5, n.3, p.243-248, 2007.
38. MAUNSELL, F.P.; DONOVAN, G.A. *Mycoplasma bovis* Infections in Young Calves. *Clinics of North America - Food Animal Practice*, USA. n.25, p.139–177, 2009.
39. MELO, D.P.G.; SILVA, A.C.; ORTEGA-MORA, L.M.; BASTOS, S.A.; BOAVENTURA, C.M.. Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*: Rio de Janeiro. n.15, v.3, p.105-109, 2006.

40. MOBERG, G.P. Effects of Environment and Management Stress on Reproduction in the Dairy Cow. *Journal of Dairy Science*, USA. v.59, n.9, p.1618-1624, 1975..
41. MORRELL, E. L; MOORE, D. P; ODEÓN, A. C; POSO, M. A; ODRIOZOLA, E; CANTÓN, G; PAOLICCHI, F; MALENA, R; LEUNDA, M. R; MORSELLA, C; CAMPERO, C. M. Retrospective study of bovine neonatal mortality: cases reported from INTA Balcarce, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. n.40, p.151-157, 2008.
42. 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, p.46-49, 1992.
43. 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.
44. PACIULLO, D.S.C.; HEINEMANN, A.B.; MACEDO, R.O. Sistemas de produção de leite baseados no uso de pastagens. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás*. v.1, n.1, p.88-106, 2005.
45. PETIT, T; SPERGSEER, J; AURICH, J; ROSENGARTEN, R. Prevalence of *Chlamydiaceae* and *Mollicutes* on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, USA. v.127, n.3-4, p.325-333, 2008.
46. PETIT, T; SPERGSEER, J; ROSENGARTEN, R. AURICH, J. Prevalence of Potentially Pathogenic Bacteria as Genital Pathogens in Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, USA. n.44, p.88–91, 2009.
47. ROSSING, W.; HOGWERF, P.H. State of the art of automatic milking systems. *Computers and Electronics in Agriculture*, USA. n.17, p.1-17, 1997.
48. SANDERSON, M.W.; CHENOWETH, A.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*, London. n.54, p.401-408, 2000.
49. SAS. *SYSTEM 2000® V2 Basic*. Multi-User™, QueX™, and Interface to CICS. SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina 27513. Setembro, 2007. Disponível em: <support.sas.com/pubs>. Acessado em: 12 de novembro de 2009.
50. SILVA, M.I.S.; ALMEIDA, M.Â.O.; MOTA, R.A.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; RABELO, S.S.A. Fatores de riscos associados à infecção por *Neospora caninum* em matrizes bovinas leiteiras em Pernambuco. *Ciência Animal Brasileira: Goiania*. v.9, n.2, p.455-461, 2008.

51. SPERGSE, J.; AURICH, C.; AURICH, J.E.; ROSENGARTEN, R. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Veterinary Microbiology*, USA. v.87, p.119–129, 2002.
52. TILLARD, E.; HUMBLLOT, P.; FAYE, B.; LECOMTE, P.; DOHOO, I.; BOCQUIER, F. Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and sub-tropical conditions. *Theriogenology*, London. n. 69, p. 443–457, 2008.
53. TÓTH, F.; GÁBOR, G.; MÉZES, M.; VÁRADI, É.; ÓZSVÁRI, L.; SASSER, R.G.; ABONYI-TÓTH, Z.S. Improving the Reproductive Efficiency by Zoo-Technical Methods at a Dairy Farm. *Reproduction in Domestic Animals*, Moscow. n.41, p.184–188, 2006.
54. VAN SCHAİK, G.; SCHUKKEN, Y.H.; NIELEN, M.; DIJKHUIZEN, A.A.; BARKEMA, H.W.; BENEDICTUS, G. Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam. n.54, p.279–289, 2002.
55. VERDIER-METZ, I.; MICHEL, V.; DELBE`S, C.; MONTEL, M.C. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology*. n.26, p.305–310, 2009.
56. WENTINK, G.H.; FRANKENA, K.; BOSCH, J.C.; VANDEHOEK, J.E.D.; VAN DEN BERG, T.H. Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Livestock Production Science*, USA. n.62, p.207–220, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de leite no Brasil é uma das atividades agropecuaristas mais susceptíveis às perdas econômicas por desordens reprodutivas. Vários são os fatores que contribuem com isto, uma vez que a introdução de animais geneticamente melhorados, a mecanização do sistema de ordenha, os programas de qualificação do produto lácteo obrigam o produtor a buscar maior produção como mecanismo compensatório aos investimentos atribuídos, e a maior produção exige também maior atenção aos fatores relacionados à sanidade animal.

Na unidade produtora de leite, a aglomeração animal, a movimentação destes animais entre o sistema de pastejo e a sala de ordenha, o estresse físico e ambiental durante os procedimentos de ordenha estimulam a liberação de hormônios tireoidianos e adrenais que controlam as funções metabólicas. Nesta regulação endócrina o sistema imunológico é influenciado negativamente e microrganismos ambientais ou contagiosos se multiplicam nos diversos sistemas do animal em produção. A introdução e a manutenção de microrganismos patogênicos no trato reprodutor se tornam fator de risco significativo para que as patologias reprodutivas se desenvolvam, principalmente quando as formas de manejo ou higiênicas favorecem a permanência destes agentes no tecido animal infectado.

A ocorrência de *Mollicutes* no sistema de produção de leite é uma das principais causas para perdas reprodutivas e conseqüentemente, baixa produtividade. Estes agentes são disseminados por animais contaminados, fomites e semen, infectando diversos sistemas, deste o auditivo, respiratório, digestivo e reprodutivo. Dentre os *Mollicutes* de maior interesse nos processos patológicos do trato reprodutivo de ocorrência no Brasil, estão o *Mycoplasma bovis*, *M. bovigenitalium* e o *U. diversum*. O isolamento destas bactérias tem sido associado com vulvovaginite granular, vulvite granular, perdas embrionárias precoces, abortos, síndrome do bezerro fraco, pneumonia no bezerro neonato e, mais recentemente, atropatia em bezerros abortados.

O isolamento microbiológico do *U. diversum* pode ser feito rotineiramente, com a atenção especial normal que é aplicada para todos os outros microrganismos Gram negativos. A ocorrência de lesões de vulvovaginite é

sugestiva da infecção por *U. diversum* e o manejo em relação aos animais e os procedimentos de higiene, principalmente em vacas de produção leiteira, são fatores predisponentes para a disseminação do agente.

A infra-estrutura dos galpões de ordenha e os sistemas de ordenha também influenciam na ocorrência de vulvovaginite em vacas leiteiras, especialmente as prenhes e de raças mais apuradas. As condições higiênicas e de manejo continuam sendo problema para as unidades de produção de leite a pasto e mesmo havendo incentivo por parte da indústria ainda há fatores que, ao serem corrigidos irão contribuir para a maior produtividade com menor custo em diagnóstico e tratamento, resultando ainda em maior valorização do produto e melhor qualidade para o consumo.