

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE TÉCNICAS DE ISOLAMENTO E PCR PARA
DETECÇÃO DE *MYCOPLASMA* E *UREAPLASMA DIVERSUM* EM MUÇO
PREPUCIAL E SÊMEN *IN NATURA* DE TOUROS DE MONTA
NATURAL E CENTRAL DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

M.V. Cardoso¹, S.R. Teixeira¹, S. Miyashiro¹, S.A. Vasconcellos², L. Gregory³, M.E. Genovez¹

¹Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: marisvc@hotmail.com

RESUMO

Com o objetivo de aprimorar os métodos diagnósticos em micoplasmoses foi realizado um estudo utilizando-se muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e de uma central de inseminação artificial com o objetivo de reduzir o tempo necessário para a emissão de resultados e aumentar os níveis de detecção, assumindo o isolamento bacteriano, técnica dependente da viabilidade microbiana, como teste gold standard. Cento e setenta e cinco amostras de muco prepucial e 143 amostras de sêmen fresco foram estudadas. Através da técnica de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), uma triagem prévia das amostras foi realizada para detecção de Mollicutes, utilizando-se o sistema MGSP/GPO-1. Primers espécie-específicos para *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* foram posteriormente utilizados. Ao isolamento, foram observados 45,1% (79/175) de positivos para Mollicutes e 66,5% (115/173) para *U. diversum* em muco de prepucial. Comparativamente, a PCR revelou 63,7% (109/171) de amostras positivas através de sistema de MGSP/GPO-1, 42,6% (72/169) de amostras positivas para *M. bovis* e 72,9% (124/170) para *U. diversum*. O estudo das amostras de sêmen apresentou 22,5% (32/142) de positivos para Mollicutes e 51,7% (74/143) para *U. diversum*, através do isolamento. Pela PCR, foram detectadas 24,1% (33/137) de amostras positivas no sistema MGSP/GPO-1, 27,4% (34/124) de amostras positivas para *M. bovis* e 56,6% (73/129) para *U. diversum*. O teste de McNemar para presença de Mollicutes em muco de prepucial ($p = 0,57$), mostrou que o sistema MGSP/GPO-1 pode ter um valor considerável quando associado à detecção específica de *U. diversum*, apresentando uma boa sensibilidade (75,2%), porém baixa especificidade (58,9%). A análise estatística mostrou que o sistema MGSP/GPO-1 de triagem poderia substituir o isolamento preliminar para *Mycoplasma* spp. em amostras de sêmen ($p = 0,86$).

PALAVRAS-CHAVE: *Mycoplasma*, *Ureaplasma diversum*, touros, sêmen, diagnóstico.

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY BETWEEN ISOLATION TECHNIQUES AND PCR FOR *MYCOPLASMA* AND *UREAPLASMA DIVERSUM* DETECTION IN PREPUCIAL MUCUS AND FRESH SEMEN FROM NATURAL BREEDING AND AI CENTER BOVINE BULLS. With the objective of improving the diagnostic methods in mycoplasmosis, a study was carried out using bovine prepucial mucus and fresh semen from natural breeding and one Artificial Insemination Center with the aim to reduce the time necessary for the emission of results and to increase the detection levels, assuming bacterial isolation, on technique that depends on microbial viability, as the gold standard test. One hundred and seventy-five prepucial mucus samples and 143 fresh semen samples were studied. By PCR (Polymerase Chain Reaction) technique, a previous screening using the MGSP/GPO-1 system was tested for Mollicutes detection. Species-specific primers for *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* were used subsequently. By isolation there were observed 45.1% (79/175) of positivity for Mollicutes and 66.5% (115/173) for *U. diversum* in prepucial mucus. Comparatively, PCR revealed 63.7% (109/171) of positive samples by MGSP/GPO-1, 42.6% (72/169) of positive samples for *M. bovis* and 72.9% (124/170) for *U. diversum*. The semen samples study

²Universidade São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

³Universidade São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica, São Paulo, SP, Brasil.

presented 22.5% (32/142) of positivity for Mollicutes and 51.7% (74/143) for *U. diversum*, by isolation. By PCR, 24.1% of positive samples were detected (33/137) using the MGSP/GPO-1 system, 27.4% (34/124) of positive samples for *M. bovis genitalium* and 56.6% (73/129) for *U. diversum*. The McNemar test for the Mollicutes presence in prepuccial mucus ($p = 0.57$) showed that the MGSP/GPO-1 system can have a considerable value when associated with specific detection of *U. diversum*, showing good sensitivity (75.2%), however lower specificity (58.9%). The statistical analysis showed that the screening by MGSP/GPO-1 system could substitute the preliminary isolation of *Mycoplasma* spp. in semen samples ($p = 0.86$).

KEY WORDS: *Mycoplasma*, *Ureaplasma diversum*, bulls, semen, diagnosis.

INTRODUÇÃO

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

Mycoplasma e *Ureaplasma diversum* são conhecidas e ocorrem predominantemente na cavidade oral, tratos respiratório e urogenital de várias espécies animais e de humanos. Estes agentes estão comprovadamente envolvidas em casos de vesiculite seminal, balanopostite, epididimite (PIŁASZEK & TRUSZCZYNSKI, 1988) e outras patologias responsáveis por alterações morfológicas e funcionais dos espermatozóides (EAGLESOME *et al.*, 1992; PANANGALA *et al.*, 1981), como diminuição da motilidade que resulta em baixa qualidade do sêmen (DOIG, 1981b; FISH *et al.*, 1985; HALL & MCENTEE, 1981; HUFFMAN *et al.*, 1985; JASPER, 1987; RAE *et al.*, 1995).

A transmissibilidade venérea dos micoplasmas e ureaplasmas para fêmeas sãs, através de partidas de sêmen contaminado, é de relevante importância (KIRKBRIDE, 1987). *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* têm distribuição mundial e podem ser disseminados através do comércio internacional de animais, sêmen industrializado e recentemente, de produtos de transferência de embriões (BRITTON *et al.*, 1988; DOIG *et al.*, 1981b; MILLER *et al.*, 1994).

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

A importância de *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* em sêmen de touros de campo e de central de inseminação (CI) é caracterizada pela interferência com a maturação espermática e diminuição da resistência do espermatozóide ao choque causado pela congelamento e descongelamento. Infecções dos testículos ou epidídimo podem resultar em alterações morfológicas (ultra-estrutural) no espermatozóide e a motilidade pré-congelamento pode diminuir (KIRKBRIDE, 1987).

Os métodos utilizados rotineiramente para a detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* estão restritos à técnicas de cultivo e identificação sorológica das cepas isoladas (Imunodifusão, Imunoperoxidase, Imunofluorescência e ELISA), métodos estes demorados, de difícil observação e dispendiosos (KUPPEVELD *et al.*, 1992; SIMECKA *et al.*, 1992). Apesar do cultivo ser considerado uma "técnica de certeza", pois através dela é possível a visualização dos microrganismos, as dificuldades encontradas na coleta do material clínico à campo, onde sua contaminação por bactérias oportunistas é fato comum, e o tempo decorrido entre a coleta e o processamento laboratorial, podem alterar a viabilidade do microrganismo, prejudicando o cultivo em meios artificiais, o que torna os resultados dos exames incertos. Estes fatores têm determinado a implementação de técnicas mais sensíveis e específicas e ao mesmo tempo mais rápidas e econômicas como técnicas moleculares. APCR (Polymerase Chain Reaction/Reação da Polimerase em Cadeia), tem sido utilizada com a intenção de tornar o diagnóstico das micoplasmoses, em geral, mais eficiente.

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

Com o objetivo de testar as técnicas diagnósticas para micoplasmoses da reprodução em bovinos, foi realizado um levantamento utilizando-se muco prepuccial e sêmen *in natura* de touros com o intuito de reduzir o tempo para emissão dos resultados

laboratoriais e melhorar os níveis de detecção dos agentes, assumindo o isolamento bacteriano laborioso, demorado e dependente de organismos viáveis, como teste gold standard.

MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais clínicos utilizados para detecção da presença de *Mycoplasma* spp., *M. bovigenitalium* e *U. diversum* foram muco prepucial e sêmen *in natura*, colhidos de touros de quatro propriedades rurais e uma central de inseminação, localizadas no Estado de São Paulo.

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

As amostras de sêmen foram colhidas por eletroejaculação, em tubos estéreis, e mantidas sob refrigeração.

Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial foi realizado através de 2 métodos distintos de detecção bacteriana: o isolamento e a PCR. Primeiramente, as amostras de muco prepucial e sêmen, foram semeadas em meios de cultura específicos para cultivo de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, ágar M (Hayflick) e U, caldos M e U, segundo RUHNKE & ROSENDAL, 1994. Os ágar M e U foram friccionados com o *swab* e, posteriormente, a partir do meio de transporte contendo muco, o volume de 0,3 mL da suspensão foi utilizado para realização de 3 diluições decimais em caldos M e U, totalizando 2 placas e 6 tubos para leitura subsequente, por amostra clínica processada. As placas de ágar foram incubadas por 15 dias, a 37° C em jarra de microaerofilia (GENOVEZ *et al.*, 1989), sob atmosfera de 95% N₂ + 5% CO₂ e O₂ residual, após a remoção do ar do interior da jarra (-600 mmHg) utilizando-se bomba de vácuo. Os caldos foram incubados por até 15 dias a 37° C, em aerobiose.

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

O crescimento de *Mycoplasma* e *Ureaplasma* foi caracterizado através de morfologia colonial típica, quando do crescimento sobre ágar. O crescimento nos caldos foi observado através da alteração da coloração dos mesmos (pela mudança do pH, o caldo amarelo se torna róseo) e/ou através de sub-cultivos (caldo ⇒ ágar) para confirmação do crescimento bacteriano.

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

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

PCR

O DNA genômico das amostras de muco prepucial foi extraído e purificado utilizando-se a técnica de Fenol - Clorofórmio (BARBEYRAC *et al.*, 1996), a partir de 1 mL dos meios de transporte A_{3XB} contendo as amostras clínicas dos animais. Para as amostras de sêmen, foi utilizada a técnica de extração de DNA CTAB (ROGERS & BENDICH, 1994). Para a execução da PCR foram utilizados os protocolos de CARDOSO *et al.* (2000), KOBAYASHI *et al.* (1997), KUPPEVELD *et al.* (1992) e SUBRAMANIAN *et al.* (1998).

Como controles positivos de reação foram utilizadas estirpes padrão ATCC (American Type Culture Collection). O controle negativo foi realizado com uma alíquota da mistura de reação sem aplicação de amostra clínica ou estirpe padrão. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose, submetidos à eletroforese e corados com brometo de etídio para visualização em transiluminador.

Análise Estatística

As provas de McNemar (SIEGEL, 1975), utilizando χ^2 , tabela 2 x 2, e índice Kappa (MACLURE & WILLET, 1987) foram utilizadas para análise comparativa entre as técnicas de cultivo e PCR, adotando-se o nível de confiança de 0,05.

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

RESULTADOS

Isolamentos e PCR

As porcentagens de detecção de *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* obtidas pelo isolamento, são apresentadas na Tabela 1.

Na Tabela 2, constam os resultados da detecção de *Mycoplasma* spp., *M. bovigenitalium* e *U. diversum* obtidos pela técnica de PCR.

A Tabela 3 apresenta as frequências de detecção de *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* por isolamento e PCR.

Tabela 1 - Cultivos para isolamento de *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* em bovinos, segundo o grupo experimental, o material clínico e o microrganismo investigado. São Paulo, 1999 - 2002.

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

¹Grupo 1: reprodutores de campo; Grupo 2: reprodutores de central de inseminação.

²Proporção: número de positivos/número de examinados.

Tabela 2 - Exames de PCR para *Mycoplasma* spp. ou *M. bovis genitalium* ou *Ureaplasma diversum* em bovinos, segundo o tipo de material clínico, o grupo experimental e o tipo de *primer* empregado. São Paulo, 1999 - 2002.

Materiais	Primers	Grupos		Total
		1 ¹	2	
		Resultados		
		Positivos/total (%)	Positivos/total (%)	Positivos/total (%)
Muco Prepucial	MGSO/GPO-1	67/88 (76,14)	42/82 (51,22)	109/170 (64,12)
	<i>M. bovis genitalium</i>	46/87 (52,87)	26/81 (31,09)	72/168 (42,85)
	<i>U. diversum</i>	78/87 (89,65)	51/83 (61,44)	129/170 (75,88)
Sêmen	MGSO/GPO-1	14/36 (38,89)	5/59 (8,47)	19/95 (20,00)
	<i>M. bovis genitalium</i>	17/36 (47,22)	4/52 (7,69)	21/88 (23,86)
	<i>U. diversum</i>	31/37 (83,78)	23/54 (42,59)	54/91 (59,34)

¹Grupo 1: reprodutores de campo; Grupo 2: reprodutores de central de inseminação.

²Proporção: número de positivos/número de examinados.

Tabela 3 - Comparação entre as frequências de detecção de *Mycoplasma* spp. ou *U. diversum* por isolamento e PCR, segundo o material clínico e o grupo estudado. São Paulo, 1999 - 2002.

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

¹Isolamento.

²Reação da polimerase em cadeia.

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

A eficiência do sistema MGSO/GPO-1 e dos *primers* espécie-específicos (Mbg e UD) utilizados na PCR, analisada pelos testes de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, índice Kappa e χ^2 de McNemar, nas amostras de muco prepucial e sêmen, pode ser observada nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

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

Tabela 4 - Análise comparativa entre o isolamento bacteriano e a PCR, técnicas utilizadas para detecção de *Mycoplasma* spp. ou *M. bovis genitalium* ou *Ureaplasma diversum* em muco prepucial bovino. São Paulo, 1999 – 2002.

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

¹Valor preditivo positivo.

²Valor preditivo negativo.

³Qui-Quadrado de McNemar.

⁴Probabilidade associada à hipótese de nulidade.

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

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

¹Valor preditivo positivo.

²Valor preditivo negativo.

³Qui-Quadrado de McNemar.

⁴Probabilidade associada à hipótese de nulidade.

DISCUSSÃO

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

Um dos poucos trabalhos comparativos enfocando a detecção de micoplasmas através da PCR e de métodos de isolamento utilizando swabs penianos, pré-ejaculados e sêmen de 438 eqüinos, relatou taxa

de 80% (352/438) de positivos pela PCR e 29% (125/438) pelo isolamento, mostrando uma diferença considerável, no entanto, estas discrepâncias estão de acordo com relatos que descrevem uma baixa sensibilidade para as técnicas de isolamento de micoplasmas a partir de amostras clínicas quando comparadas aos métodos moleculares (SPERGSEER *et al.*, 2002).

ALBERTSEN (1955), na Dinamarca, aventou a possibilidade de que microrganismos resistentes a antibióticos seriam responsáveis pela baixa fertilidade persistente em touros. Como intuito de esclarecer esta hipótese, obteve 89% (76/85) de amostras de sêmen positivas ao isolamento, para microrganismos do gênero *Mycoplasma*.

A contaminação de sêmen e muco prepucial por *U. diversum* foi verificada em 1969, na Inglaterra, quando 10 culturas de muco prepucial e 84% de 32 amostras de sêmen *in natura* foram positivas para o agente (TAYLOR-ROBINSON *et al.*, 1969). Posteriormente, ONOVIRAN *et al.* (1975), no Canadá, observaram 35% de 132 amostras de mucos prepuciais, 24% de 140 amostras de sêmen *in natura* e 14% de 42 amostras de sêmen processado, positivas para *U. diversum*. Na Tchecoslováquia, em 1978, foram observados 46,5% de positivos em 202 amostras de sêmen de touros de centrais de inseminação (DOIG, 1981a). BALL *et al.* (1987) examinaram 332 amostras de sêmen fresco e detectaram 46% de contaminação por *Mycoplasma* spp., destas, 32% também estavam contaminadas por *U. diversum*. RUHNKE (1994), no Canadá, reportou uma variação de 23 a 84% de touros positivos para *U. diversum* em sêmen fresco; contudo, as amostras de muco prepucial e secreção de uretra distal apresentaram uma variação de 29 a 100% de positivos sendo que a presença de ureaplasmas nestes sítios geralmente não está associada a sinais clínicos.

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

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

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

U. diversum e por HODGES & HOLLAND (1980), que encontraram 76% de positividade para ureaplasmas em amostras de muco prepucial bovino.

A espécie *M. bovis genitalium* foi encontrada em 56,4% (57/101) das amostras de muco prepucial no Grupo 1 e 22,1% (15/68) no Grupo 2. Nas amostras de sêmen, a freqüência encontrada foi de 43,2% (32/74) no Grupo 1 e 4,0% (2/50) no Grupo 2, confirmando os altos índices de infecção por tal agente. Dados similares foram relatados por BALL *et al.* (1987) que detectaram 48% de positivos para *M. bovis genitalium* e 72% de positivos para *Ureaplasma* em muco prepucial bovino enquanto que no sêmen, as taxas foram 20 e 32%, respectivamente.

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

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

A possibilidade de substituição da técnica de isolamento pelo sistema MGSO/GPO-1 de PCR, foi encontrada para o diagnóstico inicial (triagem) de *U. diversum* em muco prepucial e, nas amostras de sê-

men, para *Mycoplasma* spp. Apesar da comparação entre as técnicas ter apresentado esta possibilidade de substituição, novas investigações são indicadas com vistas à melhoria das características de sensibilidade e especificidade apresentadas.

Observou-se que no processamento de amostras de muco prepucial e sêmen, a PCR específica para *M. bovis genitalium* poderia substituir o isolamento, aprimorando sobremaneira o diagnóstico, já que a técnica de isolamento não é espécie-específica para esta bactéria, necessitando-se de uma prova sorológica para a tipagem bacteriana.

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

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

Os resultados obtidos neste trabalho trouxeram informações relevantes para os laboratórios diagnósticos onde a padronização de técnicas de isolamento de micoplasmas pode ser difícil. A baixa sensibilidade encontrada no diagnóstico em sêmen pode ser justificada pela presença de inibidores presentes na reação. Por outro lado, o diagnóstico molecular em muco prepucial apresentou uma boa sensibilidade, porém, baixa especificidade. A PCR para *M. bovis genitalium* apresentou excelente nível de detecção em muco prepucial e em sêmen, justificando a necessidade do diagnóstico desta espécie em reprodutores, especialmente em amostras de sêmen, que deveriam estar livres de qualquer contaminação.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento de parte deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSEN, B.E. Pleuropneumonia-Like organisms in the semen of Danish artificial insemination bulls. *Nordish Veterinaermedicin*, v.7, p.169-201, 1955.
- BALL, H.J.; LOGAN, E.F.; ORR, W. Isolation of mycoplasma from bovine semen in Northern Ireland. *Veterinary Record*, v.121, p.22-324, 1987.
- BARBEYRAC, B.; BERBÉAR, C.; TAYLOR-ROBINSON, D. PCR: Preparation of DNA from clinical specimens. In: TULLY, J.G. & RAZIN, S. (Eds.). *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. San Diego: Academic Press, 1996. v.2, p.61-64.
- BRITTON, A.P.; MILLER, R.B.; RUHNKE, H.L.; JOHNSON, W.H. The recovery of Ureaplasmas from bovine embryos following *In vitro* exposure and ten washes. *Theriogenology*, v.30, p.997-1003, 1988.
- CARDOSO, M. V.; GRASSO, L.; STEFANO, E.; OKUDA, L. H.; CUNHA, R. A. F. Isolamento de *Ureaplasma diversum* e *Mycoplasma* spp. em casos de Vulvite Granular Bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, n.2, p.172-173, 1997.
- CARDOSO, M.V.; BLANCHARD, A.; FERRIS, S.; VERLENGIA, R.; TIMENETSKY, J.; CUNHA, R.A.F. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Veterinary Microbiology*, v.72, p.241-250, 2000.
- CUNHA, R.A.F.; TAKIMOTO, S.; TAKEI, K. Modificação e padronização de meios de transporte e cultivo de Micoplasmas genitais: *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, v.23, p.170-177, 1987.
- DOIG, P.A. Bovine Genital Mycoplasmosis. *Canadian Veterinary Journal*, v.22, p.339-343, 1981a.
- DOIG, P. A.; MACKAY, A. L.; RUHNKE, H. L. Ureaplasma (T strain mycoplasma) infection in the bovine reproductive tract. *American Association of Bovine Practitioners Proceedings*, v.13, p.127-136, 1981b.
- EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M.; STEWART, R.B. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma* spp., *Chlamydia*, Phathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. *Veterinary Bulletin*, v.62, p.887-910, 1992.
- FISH, N.A.; ROSENDAL, S.; MILLER, R.B. The distribution of Mycoplasmas and Ureaplasmas in the genital tract of normal artificial insemination bulls. *Canadian Veterinary Journal*, v.26, p.13-15, 1985.
- GALEN, R.S. & GAMBINO, S.R. *Beyond normality: the predictive value efficiency of medical diagnosis*. New York: John Wiley and Sons, 1975. 237p.
- GENOVEZ, M.E.; SCARCELLI, E.; ROJAS, S. Campilobacteriose genital: proposta de diagnóstico mais sensível em touros. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.56, p.5-7, 1989.
- HALL, C.E. & McENTEE, K. Reduced post-thawing survival of sperm in bull with Mycoplasmal vesiculitis (Brief Communication). *Cornell Veterinarian*, v.71, p.111-112, 1981.
- HODGES, R.T. & HOLLAND, J.T.S. The recovery of ureaplasmas from the semen and prepuce of bulls. *New Zealand Veterinary Journal*, v.28, p.89-90, 1980.

- HUFFMAN, E.M.; CHRISTENSEN, V.; HRD, D.; JASPER, D. Epidemiology of bovine genital ureaplasma infection. *Proceedings of the Society of Theriogenology*, p.67-71, 1985.
- JASPER, D.E. Bovine mastitis due to mycoplasma. *Revue Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics), v.6, p.801-807, 1987.
- KIRKBRIDE, C.A. Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v.3, p.575-591, 1987.
- KOBAYASHI, H.; HOROSE, K.; WORARACH, A.; PAUGTES, P.; ITO, N.; MOROZUMI, T.; YAMAMOTO, K. *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovirhinis* by PCR. *Journal of Veterinary Medicine*, v.60, n.12, p.1299-1303, 1997.
- KUPPEVELD, F.J.M.; LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F.; ZOEST, M.J.; QUINT, W.G.V.; NESTERS, H.G.M.; GALAMA, J.M.D.; MELCHERS, W.J.G. Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16 rRNA amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.2606-2615, 1992.
- MACLURE, M. & WILLET, W. C. Misinterpretation and misuse of Kappa statistic. *American Journal of Epidemiology*, v.126, p.161, 1987.
- MILLER, R.B.; GHELMONSKA-SOYTA, A.; SMITS, B.; FOSTER, R.; ROSENDAL, S. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v.10, p.479-490, 1994.
- ONOVIRAN, O.; TRUSCOTT, R.B.; FISH, N.A.; BARKER, C.A.V.; RUHNKE, H.L. The recovery of mycoplasmas from the genital tracts of bulls in artificial breeding units in Ontario. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.39, p.474-475, 1975.
- PANANGALA, V.S.; WINTER, A.J.; WIESINHA, A.; FOOTE, R.H. Decreased motility of bull spermatozoa caused by *Mycoplasma bovirhinis*. *American Journal of Veterinary Research*, v.42, n.12, p.2090-2093, 1981.
- PILAZEC, J. & TRUSCZYNSKI, M. Affinity of microorganisms of the genus *Ureaplasma* to the reproductive organs of cattle. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.11, p.177-180, 1988.
- POUMARAT, F. & MARTEL, J.L. Mycoplasmoses bovines. *Revue de Medecine Veterinaire*, v.138, n.10, p.799-806, 1987.
- RAE, D.O.; CHENOWETH, P.J.; BROWN, M.B. *Ureaplasma* infection in the bovine. *Archives of STD/HIV Research*, v.7, p.239-243, 1995.
- ROGERS, S.O. & BENDICH, A.J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: GELVIN, B. & SCHILPERROOT, R.A. (Eds.). *Plant molecular biology manual*. Belgium: Kluwer Academic Publishers, 1994. v.D1, p.1-8.
- RUHNKE, H.L. Mycoplasmas associated with bovine genital tract infections. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L. (Eds.). *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames: Iowa State University Press, 1994. p.56-62.
- RUHNKE, H.L. & ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L. (Eds.). *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames: Iowa State University Press, 1994. p.141-155.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica (para as ciências do comportamento)*. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 350p.
- SIMECKA, J.W.; DAVIS, J.K.; DAVIDSON, M.K.; ROSS, S.E.; STADTLANDER, C.T.; CASSELL, G.M. Mycoplasma diseases of animals. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R.; FINCH, L.; BASEMAN, J. (Eds.). *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p.391-415.
- SPERGER, J.; AURICH, C.; AURICH, J.E.; ROSENGARTEN, R. High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Veterinary Microbiology*, v.87, p.119-129, 2002.
- SUBRAMANIAN, S.; BERGONIER, D.; POUMARAT, F.; CAPAUL, S.; SCHLATTER, Y.; NICOLET, J.; FREY, J. Specie identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* gene by PCR. *Molecular and Cellular Probes*, v.12, p.161-169, 1998.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; THOMAS, M.; DAWSON, P.L. The isolation of T-mycoplasmas from the urogenital tract of bulls. *Journal of Medical Microbiology*, v.2, p.527-533, 1969.
- TERAZAKI, M.H.F.; CAMPOS, S.G.; LIBERAL, M.H.T.; YIDA, O.; ROSSINI, A.J. Micoplasmose bovina: isolamento em sêmen diluído e tratado com antimicrobianos inespecíficos. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v.14, n.2, p.147-152, 1991.
- THIBIER, M. & GUERIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.233-251, 2000.
- VAN ENGELENBURG, F.A.; MAES, R.K.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A. Development of a rapid and sensitive polymerase chain reaction assay for detection of bovine herpesvirus type 1 in bovine semen. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.12, p.3129-3135, 1993.
- XIA, J.Q.; YASON, C.V.; KIBENGE, F.S. Comparison of dot blot hybridization polymerase chain reaction, and virus isolation for detection of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) in artificially infected bovine semen. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.59, n.2, p.102-109, 1995.

Recebido em 26/9/05

Aceito em 6/2/06