

Detecção de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum* em vacas com distúrbios reprodutivos

[*Detection of Mycoplasma spp. and Ureaplasma diversum in cow with reproductive disorders*]

M. Buzinhani, E. Metifogo, J. Timenetsky

Instituto de Ciências Biomédicas - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cidade Universitária
05508-900 - São Paulo, SP

RESUMO

Foram utilizadas 112 amostras de muco vulvovaginal, coletados de vacas com distúrbios reprodutivos, para pesquisa de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Para isolamentos, foram usados meios específicos para micoplasmas (SP-4) e para ureaplasmas. PCR genérica, PCR específica para *Mycoplasma bovis* e *nested-PCR* em tubo único para *Ureaplasma diversum* foram realizados com os DNAs extraídos das amostras. *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* foram detectados em 12,5 e 25,0%, respectivamente. A PCR genérica resultou em reações positivas em 63,4% das amostras transportadas em SP-4 e em 69,6% das transportadas em meio de ureaplasma. *M. bovis* foi detectado, na PCR específica, em 9,8% das amostras e *U. diversum*, na *nested-PCR*, em 37,5%. Houve maior sensibilidade na metodologia da PCR quando comparada à técnica de cultivo para *Mycoplasma* e *Ureaplasma*.

Palavras-chave: vaca, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*, cultura, PCR

ABSTRACT

In the study, 112 samples of vulvovaginal mucus of cows bearing reproductive disturbance were investigated for Mycoplasma and Ureaplasma. Specific media for the culture of mycoplasmas (SP-4) and ureaplasmas were used. PCR with general primers, PCR specific for Mycoplasma bovis, and nested-PCR in a single tube for Ureaplasma diversum were performed to detect DNA of the sample. Mycoplasma spp. and U. diversum were isolated in 12.5 and 25.0%, respectively. With generic PCR, positive reaction was obtained in 63.4% of the samples transported in SP-4 and 69.6% in ureaplasma medium. M. bovis was detected in 9.8% of samples and nested-PCR in a single tube for U. diversum resulted in 35.0% of positive reaction. Results demonstrated increased sensitivity of PCR methodology compared with culture technique applied to the search of microorganisms of Mycoplasma and Ureaplasma genera.

Keywords: cow, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum*, culture, PCR

INTRODUÇÃO

As infecções por micoplasmas (*Mollicutes*) em animais possuem importância histórica e persistem na atualidade interferindo na pecuária. Esses microrganismos estão associados a diversas doenças, cujos sinais clínicos podem ser na forma aguda, porém normalmente são de caráter crônico (Tully, 1993; Rosenbusch, 1994). Os micoplasmas são potenciais causadores de patologias no sistema respiratório, urogenital, glândula mamária, articulações, sistema nervoso

e conjuntiva ocular (Kirkbride, 1987; Stipkovits, 1993; Garcia et al., 1996).

Entre as espécies isoladas de bovinos, cerca de 20, *Mycoplasma bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma diversum* são considerados os patógenos de maior importância para o trato genital. Esses microrganismos estão associados a vulvovaginite granular, endometrite, salpingite, aborto e infertilidade em vacas (Miller et al., 1983; Ahmed et al., 1998). No Brasil, a pesquisa dessas espécies em bovinos é pouco frequente.

Os micoplasmas são microrganismos fastidiosos e exigem meios bastante ricos. Cuidados adicionais devem ser adotados na coleta e no transporte do material clínico para minimizar contaminações que podem inviabilizar o seu isolamento. Técnicas moleculares (PCR) têm sido utilizadas para identificação e detecção de micoplasmas e ureaplasmas em amostras clínicas (Ghadersohi et al., 1997; Cardoso et al., 2000). Essas técnicas são indicadas para a detecção dos micoplasmas devido às dificuldades encontradas no cultivo e isolamento desses microrganismos.

Os objetivos deste estudo foram isolar e identificar micoplasmas em muco vulvovaginal de vacas com distúrbios reprodutivos e otimizar a *nested*-PCR em tubo único para identificação de *U. diversum*.

MATERIAL E MÉTODOS

As cepas *M. alkalences* – PG51, *M. arginini* – PG40, *M. bovis* – Donetta, *M. bovigenitalium* e *Acholeplasma ladlawii* foram cultivadas em meios sólidos e líquidos SP-4 (Tully, 1995) e *U. diversum* – ATCC 49783 cultivada em meios sólido e líquido para ureaplasma (Ruhnke e Rosendal, 1994). Os subcultivos foram utilizados para padronização dos testes e para obtenção de DNA de referência.

Amostras de muco vulvovaginal de 112 vacas da raça Holandesa com distúrbios reprodutivos (vulvite granular, infertilidade ou aborto) foram coletadas em duplicata com o auxílio de *swabs* e transportadas em meios SP-4 e para ureaplasma. Os animais eram provenientes de sete propriedades tecnificadas dos estados de São Paulo, Goiás e Santa Catarina. Aliquotas das amostras de muco, diluídas a 10^{-3} , foram inoculadas em meios sólidos e líquidos SP-4 (Tully, 1995) e para ureaplasma (Ruhnke e Rosendal, 1994), em períodos inferiores a 24 horas da coleta.

Os isolados foram caracterizados inicialmente pela observação de colônias em ágar SP-4 na forma de “ovo frito”, formação de filmes e manchas, utilização de glicose e/ou de arginina. As culturas puras desses isolados foram submetidas ao teste de inibição de crescimento com soros hiperimunes de *M. alkalences*, *M. arginini*, *M. bovis*, *M. californicum* e *M. canadense* (Goll, 1994). No meio para

ureaplasma, foi observada 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.

Para a definição do método de extração de DNA a ser utilizado, foram testadas as metodologias descritas por Fan et al. (1995) baseadas na fervura, por Boom et al. (1990), na sílica e, por Sambrook et al. (1989), no fenol/clorofórmio. Essas extrações foram realizadas em suspensões de 200µl, na proporção de 1:1, em muco de fundo vaginal livre de micoplasmas e cultura de *M. bovis* Donetta (5×10^8 UFC). O DNA obtido pelos diferentes métodos de extração (5% do volume final em diluições de 10^{-1} a 10^{-5}) foram submetidos a PCR para detecção de *M. bovis* (González et al., 1995). A metodologia descrita por Fan et al. (1995) foi realizada para extração de DNA de 1ml das amostras clínicas.

A PCR para detecção dos gêneros pertencentes à classe *Mollicutes* (PCR genérica) foi realizada como descrita por Van Kuppeveld et al. (1992). A *nested*-PCR em tubo único para detecção de *U. diversum* foi otimizada seguindo parâmetros citados por Cardoso et al. (2000), com alteração na seqüência de oligonucleotídeos iniciadores em um dos *primers* externos. Foram analisadas em reações independentes as temperaturas de hibridação, as concentrações dos *primers* externos GPO1 (Van Kuppeveld et al., 1992) e UD₂ (Cardoso et al., 2000) e dos *primers* internos UD₃/UD₄ (Cardoso et al., 2000). As concentrações de MgCl₂ e o número de ciclos de amplificações foram otimizados com concentrações constantes de *Taq* DNA polimerase¹ e tampão da PCR e de dNTP¹. Na *nested*-PCR em tubo único, utilizaram-se 10pmol de cada *primer* GPO1/UD₂, 100pmol de cada *primer* UD₃/UD₄, 2U de *Taq* DNA polimerase, 2,5mM de MgCl₂, 150µM de cada dNTP, 2µl da amostra de DNA e água ultrapura até o volume de 100µl. A amplificação foi obtida em termociclador programado para um ciclo de 94°C por 5min, 35 ciclos de 94, 57 e 72°C por 1min, para os *primers* externos e 94°C por 5min, 35 ciclos de 94, 49°C por 1min, 72°C por 30s e um ciclo final de 72°C por 10min, para os *primers* internos. O limite de detecção foi estabelecido por meio de amplificações de diluições seriadas

¹Invitrogen® - Carlsbad, EUA.

do DNA extraído de culturas de *M. bovis* (830ng/μl) para PCR genérica e PCR *M. bovis* e de cultura de *U. diversum* (90ng/μl) para *nested*-PCR. O teste de especificidade da *nested*-PCR foi realizado com diferentes espécies de micoplasmas isoladas de bovinos.

Os produtos obtidos nas ampliações das PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 10μg/ml de brometo de etídeo em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2mM EDTA; pH 8,0), detectados sob luz ultravioleta e fotodocumentados². Incluiu-se marcador de peso molecular de 100pb DNA Ladder¹. Na Tab. 1, são apresentadas as seqüências dos *primers* utilizados nas diferentes PCRs e os respectivos produtos esperados na eletroforese.

O seqüenciamento dos produtos amplificados pela PCR específica para *M. bovis* e *nested*-PCR para *U. diversum* foi realizado no aparelho ABI

Prism 310 DNA Sequencer³. Na reação, utilizaram-se 10ng de produto purificado (Zhen e Swark, 1993), 25ng do oligonucleotídeo (MboR/UD₃), 2μl BigDT (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction *kit*³ e água ultrapura até o volume final de 6μl. Os ciclos realizados foram 1min a 96°C, 10s a 96°C, 20s a 55°C e 60°C por 4min (*M. bovis*) e 1min a 96°C, 10s a 96°C, 20s a 49°C e 60°C por 4min (*U. diversum*). Após a reação da PCR, o DNA foi precipitado, adicionando 40μl de isopropanol 75%, seguido de agitação e incubação por 15min à temperatura ambiente. Em seguida o DNA foi centrifugado por 20min a 16000 x g, lavado com 100μl de etanol 70%, resfriado e centrifugado como descrito anteriormente. Após a evaporação do etanol, o precipitado foi homogêneo em 20μl de TSR (Template Supression Reagent) para o seqüenciamento em aparelho ABI 310 e análise no programa BLAST⁴.

Tabela 1. Seqüência dos *primers* utilizados nas PCR genérica, PCR *M. bovis* e *nested*-PCR

Primers	Seqüências	Produtos esperados
GPO3 MGSO	5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T -3' 5'- TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AACCTC -3'	270pb (PCR genérica)
MboF MboR	5'- CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG -3' 5'- CCG TCA AGG TAG CAT CAT TTC CTA T -3'	360pb (PCR <i>M. bovis</i>)
GPO1 UD2	5'- CT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A -3' 5'- CCT TGC GGT AGC AGT ATC GA -3'	816pb (<i>primers</i> externos <i>nested</i> -PCR)
UD3 UD4	5'- AAT GTC GGC TCG CTT ATG AG -3' 5'- CCT GTC ATA TTG TTA ACC TCC GC -3'	216pb (<i>primers</i> internos <i>nested</i> -PCR)

O teste McNamer foi aplicado, utilizando o χ^2 , tabela 2x2, para análise comparativa entre as técnicas de cultivo e PCR aplicadas na avaliação das amostras de muco vulvovaginal. O cultivo foi adotado como prova de referência e o nível de significância igual 5% (Siegel, 1956).

RESULTADOS

Foram obtidos 14 isolados de *Mycoplasma* spp. (12,5%) em meio SP-4 (Tab. 2). Ao se utilizar inibição de crescimento com os soros hiperimunes das principais espécies de importância para bovinos, não se identificaram os isolados, que foram classificados como *Mycoplasma* spp.

²Vilber Loumat – Marne-la-Vallée, França.

³PE Applied Biosystems – Foster City, EUA.

⁴BLAST. Available. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Detecção de Mycoplasma spp. ...

Ureaplasmas foram isolados de 28 amostras (25,0%).

A escolha do método de extração foi realizada após análise da PCR específica para *M. bovis* com DNA extraído da suspensão de muco de fundo de vagina/cultura desse microrganismo. Na Fig. 1-B, observa-se maior sensibilidade da PCR quando realizada com o DNA extraído pelo método de fervura descrito por Fan et al. (1995).

Foram obtidas reações positivas em 71 (63,4%) e 78 amostras (69,6%) na PCR genérica realizada a partir do DNA do material clínico transportado nos meios SP-4 e para ureaplasma, respectivamente (Tab. 3). O limite de detecção dessa metodologia foi de 830fg. A Fig. 2 mostra as reações obtidas na PCR genérica com DNA de diferentes espécies de micoplasmas e amostras clínicas de bovinos. Na PCR para detecção de *M. bovis*, o limite de detecção foi de 415fg (Fig. 3) e foram obtidas 11 reações (9,8%) positivas com o DNA extraído das amostras clínicas. Reações positivas foram obtidas em 42 amostras clínicas (37,5%) com a *nested-*

PCR. A especificidade da *nested-PCR* foi testada com o DNA de micoplasmas isolados do trato reprodutivo bovino, obtendo-se reação positiva apenas com o DNA de *U. diversum*. O limite de detecção correspondeu a 180pg. O seqüenciamento dos produtos da PCR para *M. bovis* e *U. diversum* mostrou 100% de similaridade com a seqüência depositada no GenBank para as duas espécies.

Tabela 2. Isolados obtidos do cultivo em meios SP-4 e para ureaplasma das amostras clínicas de muco vulvovaginal de vacas provenientes de diferentes propriedades

Propriedades	N° de animais	Culturas positivas			
		SP-4		Ureaplasma	
		N	%	N	%
1 (SP) ¹	11	2	18,2	0	0
2 (SP)	24	8	33,3	3	12,5
3 (SP)	16	0		12	75,0
4 (SP)	21	0		9	42,8
5 (GO)	25	4	16,0	4	16,0
6 (SP)	6	0		0	0
7 (SC)	9	0		0	0
Total	112	14	12,5	28	25,0

¹Estado de procedência.

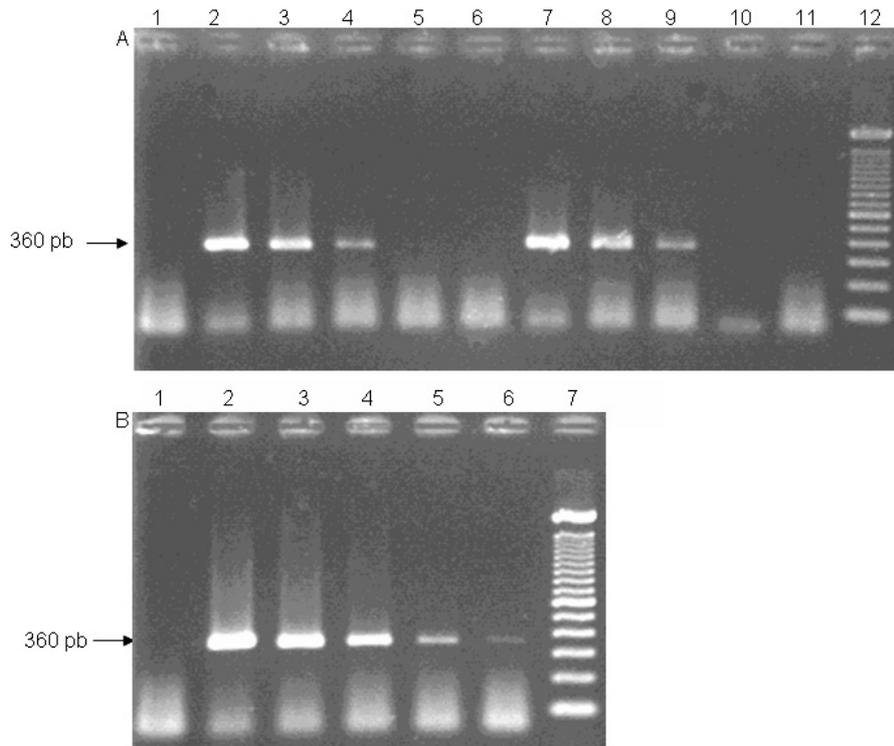


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR com os primers MboF/R. DNA extraído de suspensões de muco de fundo de vagina/culturas de *Mycoplasma bovis* Donetta por diferentes métodos. A) 1: controle negativo; 2 a 6: extração por sílica (diluições 10⁻¹ a 10⁻⁵, respectivamente); 7 a 11: extração por fenol/clorofórmio (diluições 10⁻¹ até 10⁻⁵, respectivamente); 12: padrão de peso molecular 100pb. B) 1: controle negativo; 2 a 6: extração por fervura (diluições 10⁻¹ até 10⁻⁵, respectivamente); 7: marcador de peso molecular 100pb.

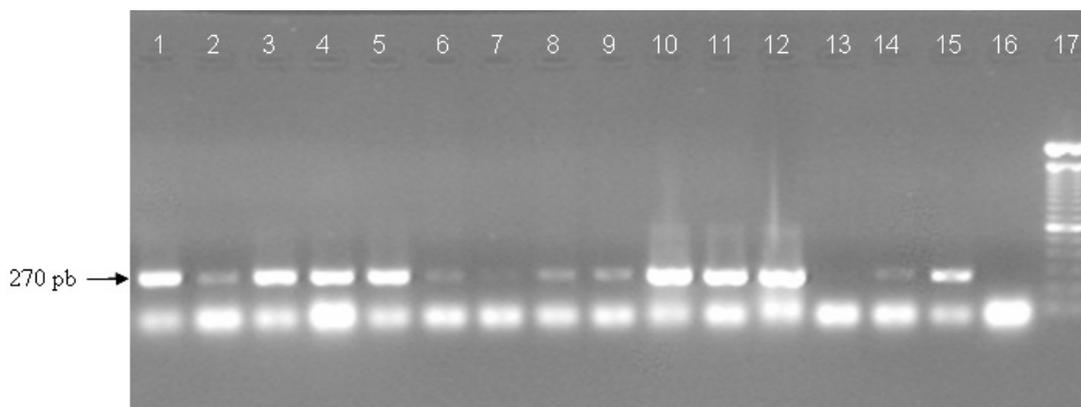


Figura 2. Eletroforese em gel agarose de produtos obtidos pela PCR genérica (primers GPO-3/MGSO). 1: *Mycoplasma bovis genitalium*; 2: *M. alkalences*; 3: *M. arginini*; 4: *Ureaplasma diversum*; 5: *Acholeplasma laidlawii*; 6 a 14: muco vulvovaginal de vacas; 15: *M. bovis*; 16: controle negativo; 17: padrão de peso molecular de DNA 100pb.

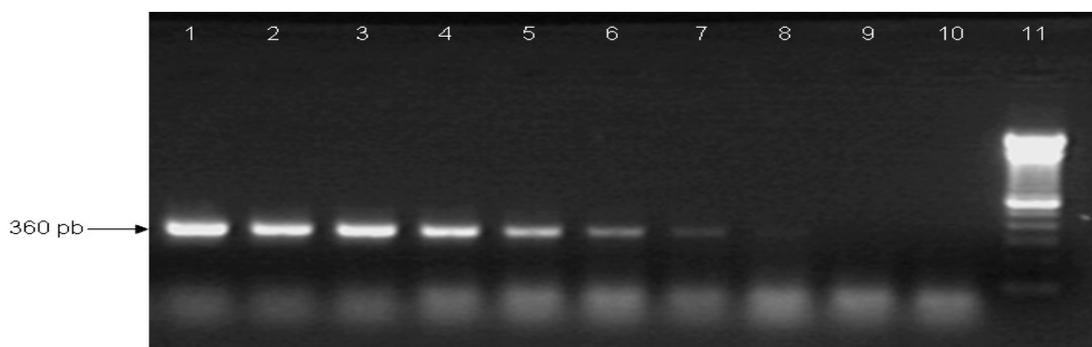


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos pela PCR específica para *Mycoplasma bovis* (primers MboF/R) com diluições do DNA de *M. bovis* Donetta. A avaliação da sensibilidade da técnica foi realizada por meio de diluições decimais. 1: 4150ng; 2: 415ng; 3: 41,5ng; 4: 4,15ng; 5: 415µg; 6: 41,5µg; 7: 4,15µg; 8: 415fg; 9: 41,5fg; 10: controle negativo; 11: padrão de peso molecular DNA 100pb.

Na análise da PCR genérica realizada com DNA extraído de amostras transportadas em meio para ureaplasma e SP-4 em relação ao cultivo, obteve-se uma diferença de positividade significativa ($P > 0,05$) de 48,0 e 55,1 no teste de χ^2 , que se

encontram acima do valor crítico desta prova. Na análise da *nested*-PCR em relação ao cultivo, foi obtido o valor de 5,41 no teste χ^2 , demonstrando diferença significativa entre as técnicas ($P < 0,05$).

Tabela 3: Reações positivas obtidas nas PCR genérica, PCR específica para *Mycoplasma bovis* e *nested*-PCR para *Ureaplasma diversum* de amostras de muco vulvovaginal, transportadas nos meios SP-4 e para ureaplasma, de vacas provenientes de diferentes propriedades

Propriedades	N° de Animais	PCR genérica (SP-4)		PCR genérica (ureaplasma)		PCR <i>M. bovis</i>		<i>nested</i> -PCR <i>U. diversum</i>	
		N	%	N	%	N	%	N	%
1 (SP) ¹	11	8	72,7	8	72,7	0		2	18,2
2 (SP)	24	19	79,2	14	58,3	0		4	16,7
3 (SP)	16	5	32,2	12	75,0	0		10	62,5
4 (SP)	21	8	38,1	13	61,9	0		6	28,6
5 (GO)	25	24	96,0	24	96,0	10	40,0	19	76,0
6 (SP)	6	1	16,7	1	16,7	1	16,7	1	16,7
7 (SC)	9	6	66,7	6	66,7	0		0	
Total	112	71	63,7	78	69,6	11	9,8	42	37,5

¹Estado de procedência

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O material clínico utilizado neste trabalho foi satisfatório para o cultivo e isolamento de micoplasmas e para extração de DNA para PCR e está em concordância com a literatura que indica esse material para o estudo das micoplasmoses do trato reprodutivo bovino (Cottew, 1970; Langford, 1975, Ball e McCaughey, 1979).

As espécies *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *M. canadense*, implicadas como agentes de infertilidade, de aborto ou de lesões como vulvite granular em vacas, não foram isoladas no cultivo em meio SP-4. Foram obtidos isolamentos de micoplasmas classificados como *Mycoplasma* spp. em 12,5% das amostras. Cottew, (1970) e Langford, (1975) relataram o isolamento de *Mycoplasma* spp. em animais sadios. Os isolados não identificados podem ser de espécies não patogênicas encontradas na microbiota do trato reprodutivo de bovinos, como *M. verecundum* e *Mycoplasma* sp. Micoplasmas da microbiota residente, entretanto, não devem ser totalmente desconsiderados em processos infecciosos devido ao oportunismo dessas bactérias.

U. diversum foi considerado comensal por muito tempo e atualmente tem importância veterinária. Esse microrganismo é frequentemente isolado de vacas com histórico de aborto (Maxie, 1986) e com lesões em vulva (Mulira et al., 1992). Neste estudo, foi isolado em 25,0% das amostras de muco vulvovaginal de vacas com distúrbios reprodutivos. Cardoso et al. (2000), no Brasil, isolaram *U. diversum* em 35,7% de 168 amostras de muco vulvovaginal de vacas.

O cultivo de micoplasmas pode ser prejudicado, mesmo quando se utilizam condições ideais. O tipo de amostra clínica, o método de coleta e transporte, a exigência nutricional e o número de micoplasmas viáveis no material clínico podem interferir no cultivo. Técnicas derivadas da biologia molecular estão sendo aplicadas na medicina veterinária, e a PCR tem sido de ampla utilidade no diagnóstico precoce de doenças. Essa metodologia é bastante sensível, e sua padronização para detecção de DNA em diferentes tipos de materiais clínicos deve ser realizada.

A extração de DNA pela fervura (Fan et al., 1995) demonstrou ser uma técnica de rápida execução, baixo custo, sem utilização de reagentes tóxicos e com boa aplicabilidade em amostras de muco vulvovaginal. O método de extração de DNA a ser empregado deve ser analisado de acordo com o material clínico, para que não permaneçam inibidores da reação de amplificação. A fervura é um método simples que minimiza as perdas do material durante o processamento e possivelmente inativa os inibidores da PCR.

A PCR com *primers* genéricos (GPO3/MGSO), realizada com DNA obtido das amostras de muco vulvovaginal, foi utilizada como triagem para detecção de gêneros pertencentes à classe *Mollicutes*, para posterior identificação com PCR específico. A superioridade da PCR genérica em relação à cultura justifica-se por sua capacidade em detectar material genético de *Mycoplasma* spp. não cultiváveis, presentes no trato reprodutivo bovino, e por sua alta sensibilidade (830fg de DNA). Van Kuppeveld et al. (1992) relataram a detecção limite de 1pg, com *primers* GPO1 e MGSO, com DNA de *M. pneumoniae*.

A PCR para detecção de *M. bovis* mostrou-se satisfatória e detectou 11 amostras (9,8%). Os resultados negativos obtidos na cultura quando comparados às reações positivas na PCR, podem sugerir que o número de bactérias viáveis no material clínico foi insuficiente para o isolamento ou houve contaminação das amostras. O limite de detecção, obtido neste estudo, de 415fg, aproxima-se dos trabalhos de Hotzel et al. (1993), González et al. (1995) e Ghadersohi et al. (1997), que, ao utilizarem a PCR para detecção direta de *M. bovis* no leite e em amostras nasais de bezerros com pneumonia, verificaram sensibilidade de 10 a 400fg de DNA. A PCR específica para detecção de *M. bovis* tem sido utilizada em amostras de leite e muco nasal (Hayman e Hirst, 2003; Foddai et al., 2005), não há descrição, porém, para amostras de muco vulvovaginal. A metodologia aplicada neste estudo, portanto, poderá ser utilizada para essas amostras, o que possibilitará ampliar os dados sobre a ocorrência de *M. bovis* em bovinos com distúrbios reprodutivos.

A *nested*-PCR em tubo único foi otimizada para a detecção de *U. diversum*. Foram testadas temperaturas mais baixas de hibridação para os

primers internos e temperaturas mais altas para os *primers* externos, impedindo a interferência cruzada entre eles. Assim, a atuação de ambos os pares de *primers* foi realizada de forma independente. Concentrações variadas dos *primers* externos foram testadas, optando-se por uma que possibilitasse todo seu uso no primeiro estágio de ampliações. Dessa forma, os *primers* externos não interferiram na cinética do segundo ciclo.

Hopert et al. (1993) e Verdin et al. (2000) relataram a alta sensibilidade de *nested*-PCR. A técnica, porém, requer cuidados adicionais pela maior possibilidade de contaminações. *Nested*-PCR em tubo único é uma alternativa para diminuir o risco de contaminação. A sensibilidade da metodologia (90pg), observada neste trabalho, foi maior que a descrita até o momento na literatura (Cardoso et al., 2000).

Na *nested*-PCR foram obtidas 25 amostras positivas, que foram negativas na cultura. Este fato pode ser justificado pela alta sensibilidade da PCR utilizada. Cultura positiva e *nested*-PCR negativa foram observadas, o que pode ser devido a perdas de DNA durante o processo de extração. Mediante os achados, a necessidade de associação da PCR e do cultivo fica evidente para o diagnóstico da micoplasmose em bovinos com distúrbios reprodutivos. A baixa porcentagem de isolamento de ureaplasmas por meio de cultivo pode estar relacionada ao transporte das amostras clínicas (oscilações na temperatura ambiental entre a coleta e o processamento da amostra) ou à presença de outros microrganismos de crescimento mais rápido. Os ureaplasmas podem perder sua viabilidade antes de serem incubados, porém, quando não ocorre a degradação completa do DNA, podem ser detectados pela PCR.

A necessidade de se viabilizar técnicas mais eficientes para o diagnóstico de distúrbios reprodutivos causados por agentes infecciosos é de grande importância para se obter um controle mais efetivo das doenças, diminuindo, assim, as perdas econômicas do produtor.

Testes para *Mycoplasma* spp., em casos de distúrbios reprodutivos dos bovinos, não são feitos rotineiramente no Brasil, o que dificulta avaliar o seu real envolvimento nesses casos. Pesquisas relacionadas à epidemiologia e à

patogenia desses microrganismos devem ser realizadas para o melhor conhecimento e desenvolvimento de métodos de controle e tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, A.; SABRY, M.; ZAKI, K.M. Possible role of Mycoplasmas in some reproductive disorders of cattle and buffaloes in Egypt. *Egypt. J. Vet. Sci.*, v.32, p.115-122, 1998.
- BALL, H.J.; MCCAUGHEY, W.J. Distribution of mycoplasmas within the urogenital tract of the cow. *Vet. Rec.*, v.104, p.482, 1979.
- BASEMAN, J.B.; TULLY, J.G. Mycoplasmas: Sophisticated reemerging and burdened by their notoriety. *Emerg. Infec. Dis.*, v.3, p.1-15, 1997.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p.495-503, 1990.
- CARDOSO, M.V.; BLANCHARD, A.; FERRIS, S. et al. Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay. *Vet. Microbiol.*, v.72, p.241-250, 2000.
- COTTEW, G.S. Mycoplasma isolated from cattle in Australian. *Aust. Vet. J.*, v.46, p.378-381, 1970.
- FAN, H.H.; KLEVEN, S.H.; JACKWOOD, M.W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian. Dis.*, v.39, p.729-735, 1995.
- FODDAI, A.; IDINI, M.; FUSCO, M. et al. Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agactiae* and *Mycoplasma bovis* based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. *Mol. Cell. Probes*, v.19, p.207-212, 2005.
- GARCIA, M.; JACKWOOD, M.W.; HEAD, M. et al. Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synovia*, and *M. iowae* PCR amplication products. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.8, p.56-53, 1996.
- GHADERSOHI, A.; COELEN, R.J.; HIRST, R.G. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, v.56, p.87-98, 1997.

- GOLL Jr., F. Identification of mycoplasmas isolated from domestic animals. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. (Eds). *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Ames: Iowa State University, 1994. p.15-26.
- GONZÁLEZ, Y.R.C.; ROS BASCUÑANA, C.; BÖLSKE, G. et al. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. *Vet. Microbiol.*, v.47, p.183-190, 1995.
- HAYMAN, B.; HIRST, R. Development of a semi-nested PCR for the improved detection of *Mycoplasma bovis* from bovine milk and mucosal samples. *Vet. Microbiol.*, v.91, p.91-100, 2003.
- HOPERT, A.; UPHOFF, C.C.; WIRTH, M. et al. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for detection of mycoplasma contamination in cell lines. *J. Immunol. Methods*, v.164, p.91-100, 1993.
- HOTZEL, H.; DEMUTH, B.; SACHE, K. et al. Detection of *Mycoplasma bovis* using *in vitro* deoxyribonucleic acid amplification. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.*, v.12, p.581-591, 1993.
- KIRKBRIDE, C.A. Mycoplasma, ureaplasma, and acholeplasma infections of bovine genitalia. *Vet. Clin. N. Am.: Food Anim. Pract.*, v.3, p.575-591, 1987.
- LANGFORD, E.V. Mycoplasma species recovered from the reproductive tracts of Western Canadian cows. *Can. J. Comp. Med.*, v.39, p.133-138, 1975.
- MAXIE, M.G. Etiologic agent or condition associated with abortion in cattle. VLS, Guelph, 1983-85. *Can. Vet. J.*, v.27, p.1983-85, 1986.
- MILLER, R.B.; RIHNKE, H.L.; DOIG, P.A. et al. The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows. *Theriogenology*, v.20, p.367-373, 1983.
- MULIRA, G.L.; SAUNDERS, R.; ARTH, A.D. Isolation of *Ureaplasma diversum* and mycoplasma from genital tracts of beef and dairy cattle in Saskatchewan. *Can. Vet. J.*, v.33, p.46-49, 1992.
- ROSENBUSCH, R.F. Biology and taxonomy of the mycoplasma. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. (Eds). *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. Ames: Iowa State University, 1994. p.3-11.
- RUHNKE, H.L.; ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. (Eds). *Mycoplasmosis in animals: Laboratory Diagnosis*. Ames: Iowa State University, 1994. p.141-144
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. p.9.16-9.19.
- STIPKOVITS, L.; RADY, M.; GLÁVITS, R. Mycoplasmal arthritis and meningitis in calves. *Acta Vet. Hung.*, v.41, p.73-88, 1993.
- TULLY, J.G. Current status of the mollicute flora of humans. *Clin. Infect. Dis.*, v.17, p.S2-S9, 1993.
- TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In: TULLY, J.G.; RAZIN, S. (Eds). *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. San Diego: Academic Press Inc., 1995. p.33-40.
- VAN KUPPEVELD, F.J.M.; VAN DER LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F. et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* v.58, p.2606-2615, 1992.
- VERDIN, E.; SAILLARD, C.; LABBÉ, A. et al. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet. Microbiol.* v.76, p.31-40, 2000.
- ZHEN, L.; SWANK, R.T. A simple and high yield method for recovering DNA from agarose gels. *Bio Techniques.*, v.14, p.894-896, 1993.
- SIEGEL, S. Two related samples. Non-parametric statistic for the behavioral sciences, New York: McGraw-Hill, 1956. 312p.