

## IMPORTÂNCIA DAS MICOPLASMOSES NA FERTILIDADE DE TOUROS

M.V. Cardoso<sup>1</sup> & S.A. Vasconcellos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: marisvc@hotmail.com

## RESUMO

O estudo das micoplasmoses da reprodução em bovinos tem apresentado resultados indicativos de que estas enfermidades estão presentes na rotina dos veterinários de campo brasileiros e podem estar acarretando perdas econômicas significativas aos produtores rurais. Micoplasmas e ureaplasmas podem causar orquite, vesiculite seminal, balanopostite e epididimite em touros com conseqüente perda da qualidade seminal e capacidade de fertilização. Esta revisão apresenta informações específicas sobre o assunto, favorecendo a pesquisa dos interessados na área.

PALAVRAS-CHAVE: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, micoplasmoses, touros, bovinos, fertilidade.

## ABSTRACT

IMPORTANCE OF *MYCOPLASMA BOVIS*, *M. BOVIGENITALIUM* AND *UREAPLASMA DIVERSUM* IN THE FERTILITY OF BULLS. The study of the reproductive mycoplasmosis in cattle has been presenting results which indicate that these illnesses are present in the routine of the Brazilian field veterinarians and that it can be resulting in significant economic losses for the producers. Mycoplasmas and ureaplasmas can cause orchitis, seminal vesiculitis, balanoposthitis and epididymitis in bulls with consequent loss of the seminal quality and fertilization capacity. This review presents specific information on the subject, favoring research in the area.

KEY WORDS: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, mycoplasmosis, bulls, bovine, fertility.

Várias são as doenças infecciosas que afetam o desempenho reprodutivo de bovinos: brucelose, leptospirose, campilobacteriose, rinotraqueite infecciosa bovina, diarreia viral bovina e tricomoníase, estão entre as mais freqüentemente associadas a distúrbios reprodutivos (KIRKBRIDE, 1987; EAGLSOME *et al.*, 1992). Ao lado destas doenças, várias outras, menos conhecidas e conseqüentemente, pouco divulgadas, como as micoplasmoses, deveriam ser investigadas, pois resultam em quadro sintomatológico semelhante aquelas 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).

A reprodução animal dos dias de hoje é programada para propiciar retorno econômico ao proprietário rural. Várias técnicas têm sido implementadas e implantadas para aumentar a produtividade individual e, paralelamente, o desempenho do conjunto de animais em fase de reprodução. Técnicas como Inseminação Artificial (IA), Transferência de Embriões

(TE), Fecundação *In Vitro* (FIV) e o desenvolvimento de drogas e metodologias cada vez mais eficientes para sincronização de cio, são exemplos da tecnologia desenvolvida para melhorar a produtividade dos rebanhos. A presença de microrganismos causadores de doenças infecciosas pode atingir diretamente esta produtividade (CARDOSO, 2003).

Uma contaminação bacteriana maciça do sêmen congelado pode afetar a fertilidade. Neste caso, quando microrganismos patogênicos são veiculados por meio da inseminação artificial, eles não têm que atravessar a mucosa vaginal ou cervical, que agem como barreiras para bactérias, mas são introduzidos diretamente no útero (FLATSCHER & HOLZMANN, 1981).

A utilização da inseminação artificial (IA) tornou possível o intercâmbio de material genético de melhor qualidade e, através dessa tecnologia, uma melhora da produção de leite e carne, em nível nacional e internacional. Entretanto, as possibilidades da contaminação do sêmen por agentes patogênicos e a sua disseminação através do mesmo converteram-se

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

em uma das principais preocupações para criadores e autoridades sanitárias dos países onde se emprega essa tecnologia (AFSHAR & EAGLESOME, 1990). A tudo isso se deve, também, acrescentar o risco do uso do sêmen infectado nos processos de transferência de embriões (BIELANSKI & DUBUC, 1994). Este alarme crescente está relacionado às implicações epizootiológicas da presença de microrganismos no sêmen, implicações estas que não só se centram na infecção exclusiva da fêmea receptora ou do coletivo da exploração pecuária, como também na possível introdução de doenças exóticas no país importador (SILVA, 2003).

Os fatores mais importantes que desencadeiam perdas econômicas devido à presença de micoplasmas e ureaplasmas em propriedades agropecuárias são: diminuição do número de gestações, ocorrência de perdas fetais ou partos prematuros com conseqüente diminuição do número de serviços por animal, perdas na qualidade do sêmen e aumento dos custos com veterinários e drogas para tratamento das infecções (HUFFMAN *et al.*, 1985; MILLER *et al.*, 1994).

### Ocorrência

ALBERTSEN (1955), na Dinamarca, aventou a possibilidade de que microrganismos resistentes à antibióticos seriam responsáveis pela baixa fertilidade persistente em touros. Com o intuito de esclarecer esta hipótese, detectou 89% (76/85) de amostras positivas para microrganismos do gênero *Mycoplasma* em sêmen. A partir deste período, o isolamento de micoplasmas e ureaplasmas em sêmen e amostras coletadas de trato reprodutivo de touros tem sido relatado.

A contaminação de sêmen e muco prepucial por *U. diversum* foi verificada em 1969, na Inglaterra, quando dez 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).

POUMARAT & MARTEL (1987) relataram que a frequência de contaminação de sêmen por micoplasmas e ureaplasmas variou de acordo com as pesquisas em sêmen *in natura* e sêmen industrializado. A variação também pode ser encontrada entre propriedades, centrais de inseminação e de acordo com as estações do ano. Aproximadamente, 40 a 80% dos espermas são infectados por microrganismos da Classe *Mollicutes* e as associações entre espécies é freqüente. A taxa de

isolamento em touros é muito variável: 6 a 67%. De 60 a 100% dos micoplasmas isolados são *M. bovis genitalium* enquanto que *M. bovis* representa aproximadamente 3% dos isolados.

A maior taxa de isolamento de *Mycoplasma* (71%) foi conseguida em vacas com baixa fertilidade comparado com 24% de vacas descartadas por outras razões (GOURLAY, 1973).

FISH *et al.* (1985), no Canadá, observaram que 28% dos touros utilizados para inseminação artificial apresentavam o sêmen contaminado por espécies de micoplasma, porém nenhuma estirpe de *M. bovis* foi isolada. GARCIA *et al.* (1986), no Canadá, processaram 2.950 amostras e nenhum *M. bovis* foi detectado.

BALL *et al.* (1987) examinaram 332 amostras de sêmen fresco e detectaram 46% de contaminação por *Mycoplasma* spp., destas, 32% também estavam contaminadas por *Ureaplasma 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.

LE GRAND *et al.* (1995), na França, isolaram *U. diversum* em 74% (37/50) das amostras de sêmen analisadas. Os sorogrupos B e C foram predominantes em machos.

O *Mycoplasma bovis* foi identificado pela primeira vez no Brasil por ROSSINI (1978) em bezerros com pneumonia em uma propriedade localizada no Estado de São Paulo. Posteriormente, LIBERAL *et al.* (1982) relataram o isolamento de *Mycoplasma* spp. em casos de pneumonia bovina no Estado do Rio de Janeiro.

TERAZAKI *et al.* (1991) relataram a presença de algumas espécies do gênero *Mycoplasma* em sêmen bovino processado em Centrais de Inseminação e em sêmen colhido em propriedades rurais do Estado de São Paulo.

NASCIMENTO *et al.* (1998), no Estado do Rio de Janeiro, isolaram *Mycoplasma* spp. a partir de sêmen *in natura* de 7 touros mestiços Charolês x Nelore, em rebanho que apresentava infertilidade e abortamentos e que era comprovadamente livre de brucelose, campilobacteriose e tricomonose.

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 7 propriedades da macro região de Itapetininga, 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).

## Etiologia

Quando NOCARD & ROUX (1898) isolaram micoplasmas pela primeira vez em meio artificial, estes microrganismos passaram a ser conhecidos como "Pleuropneumonia Like Organisms" (PPLO) ou organismos semelhantes aos causadores da Pleuropneumonia, primeira patologia reconhecida por tais agentes.

Os micoplasmas e ureaplasmas pertencem à classe *Mollicutes*, ordem *Mycoplasmatales*, família *Mycoplasmataceae*, gêneros *Mycoplasma*, com 85 espécies descritas, e *Ureaplasma*, cinco espécies (TULLY *et al.*, 1993). A principal característica da família é a necessidade de esteróis para o seu desenvolvimento (RAZIN & TULLY, 1983; BERGEY *et al.*, 1994).

Micoplasmas e ureaplasmas são os menores procariontes conhecidos, auto-replicantes, com tamanho variando de 0,3 até 0,8 µm, formam colônias de aproximadamente 1 mm de diâmetro e se caracterizam pela ausência de parede celular (KIRKBRIDE, 1987). A ausência de parede celular determina a morfologia colonial em meio sólido em forma de "ovo-frito". Estes agentes necessitam de atmosfera com concentração de 5 a 15% de dióxido de carbono para apresentar crescimento satisfatório em meios de cultura artificiais.

Os *Mollicutes* apresentam metabolismo e vias biossintéticas limitadas em função do reduzido genoma (580 à 2200 kb) da maioria das espécies. Desta maneira o seu cultivo exige meios enriquecidos, contendo precursores para a biossíntese do ácido nucléico, proteínas e lipídios (ROSEMBUSH, 1994).

*Ureaplasma diversum* é a única espécie do gênero descrita em bovinos (HOWARD, 1984) e inclui 3 sorotipos (A, B e C) aos quais são atribuídos graus distintos de patogenicidade (HOWARD *et al.*, 1973; RUHNKE *et al.*, 1984). Os sorotipos também podem ser caracterizados como *Ureaplasma diversum* A417 (sorotipo A), D48 (sorotipo B) e T44 (sorotipo C).

## Patogenia

As doenças desencadeadas por *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* são conhecidas genericamente por micoplasmoses. Estes agentes ocorrem predominantemente na cavidade oral, tratos respiratório e urogenital de várias espécies animais e de humanos.

Algumas espécies de *Mycoplasma*, assim como *Ureaplasma diversum*, estão comprovadamente envolvidas em casos de vesiculite seminal, balanopostite, epididimite (PIŁASZEK & TRUSZCZYNSKI, 1988) e outras patologias responsáveis por alterações morfológicas e funcionais dos espermatozóides em bovinos (EAGLESOME *et al.*, 1992; PANANGALA *et al.*, 1981), como diminuição da motilidade que resulta em baixa qualidade do sêmen (DOIG, 1981b; HALL & McENTEE, 1981;

FISH *et al.*, 1985; HUFFMAN *et al.*, 1985; JASPER, 1987; KIRKBRIDE, 1987; EAGLESOME *et al.*, 1992; RAE *et al.*, 1995).

A inflamação da vesícula seminal ocasionalmente resulta em sinais sistêmicos que podem ser confundidos com peritonite de outras origens (TIMONEY *et al.*, 1998). Touros de qualquer idade podem desenvolver a doença, porém a incidência da infecção é maior em animais jovens criados em grupos devido à atividade de monta freqüentemente observada entre eles, o que permite a contaminação do prepúcio e do pênis, que pode resultar em infecção ascendente.

Ureaplasmas colonizam as membranas celulares (espermatozóides, zona pelúcida embrionária, célula endometrial) e interferem com a espermatogênese, transporte espermático e capacidade de fecundação (EAGLESOME *et al.*, 1992; KIRKBRIDE, 1987). Estas manifestações apresentam reconhecida importância quando do controle reprodutivo em propriedades economicamente exploradas, pois podem causar redução em diferentes níveis da produção com conseqüente prejuízo econômico (RUHNKE & ROSENDAL, 1994).

Um dos mecanismos de patogenicidade de micoplasmas e ureaplasmas é o alto grau de especificidade e capacidade de aderência às células do hospedeiro, com preferência pelas células mesenquimatosas que revestem as cavidades serosas, articulações e membranas dos sistemas respiratório, digestivo e urogenital (HOWARD, 1984). Ureaplasmas exercem seu poder lesivo tecidual por meio da produção de amônia (MILLER *et al.*, 1994) que leva a perda da atividade ciliar e a destruição das células do oviduto e do endométrio (THORNBER, 1982).

Micoplasmas e ureaplasmas modificam rapidamente a natureza e estrutura dos componentes de sua membrana de superfície. Esta rápida modificação deve-se ao mecanismo de expressão dos genes codificadores de antígenos, que determina a variabilidade nas proteínas de superfície. Esta característica lhes confere resistência à tentativa de destruição pelos sistemas de defesa do hospedeiro (POUMARAT *et al.*, 1997) e pode ser este, um dos fatores relacionados à cronificação da doença. Além desta característica de resistência, sabe-se que o exsudato fibrinoso presente nas infecções os protege da ação dos anticorpos e das drogas antimicrobianas, permitindo a instalação e manutenção da doença, que muitas vezes torna-se crônica (EICHWALD *et al.*, 1973).

Diferentes espécies de micoplasmas apresentam mecanismos distintos de patogenicidade. Causam uma série de reações imunológicas que conduzem a alterações imunopatológicas.

*M. bovis* é reconhecido patógeno e causa endometrite, salpingite, ooforite, abortamento e vesiculite seminal. É também um importante agente de mastite, artrite e pneumonia (RUHNKE & ROSENDAL, 1994). HIRTH *et al.* (1966), observaram que 10 de 12

novilhas inseminadas com sêmen contaminado pelo agente, apresentaram vários episódios de repetição de cio e à necropsia, em 4 de 8 animais, foram observados graus variados de salpingite supurativa crônica, endometrite crônica e adesão ovariana.

*Mycoplasma bovis genitalium* é uma espécie freqüentemente encontrada no trato genital bovino e causa infertilidade, endometrite necrotizante, vesiculite seminal e problemas na motilidade espermática (RUHNKE & ROSENDAL, 1994). As infecções genitais causadas pelo agente em fêmeas são caracterizadas por vulvovaginite granular, com descarga vaginal mucopurulenta, podendo ou não apresentar infertilidade. Mastite e abortamento também são relatados (EAGLESOME *et al.*, 1992). O microrganismo, como comensal do trato reprodutivo posterior, pode ser introduzido no útero através da inseminação artificial ou monta natural e causar endometrite, interferindo com a implantação do embrião ou mesmo resultando em sua morte (MILLER *et al.*, 1994).

A transmissibilidade venérea dos micoplasmas e ureaplasmas para fêmeas sãs, através de partidas de sêmen contaminado, é de relevante importância. Quando 2 touros naturalmente infectados com *M. bovis genitalium* foram utilizados para servir 17 novilhas não infectadas previamente, 14 fêmeas tornaram-se positivas à cultura em um intervalo de 21 dias (KIRKBRIDE, 1987).

*Mycoplasma* spp. e *U. diversum* têm distribuição mundial e podem ser disseminados por meio 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).

O estudo do gênero *Ureaplasma* tem grande importância na medicina humana. *Ureaplasma urealyticum* é agente de sérias patologias urogenitais: uretrites não-gonocócicas, cistites, abortamentos, placentites, diminuição da capacidade reprodutiva e alterações na qualidade seminal, são problemas observados freqüentemente (QUINN *et al.*, 1983; TAYLOR-ROBINSON & MCCORMACK, 1980). O *Ureaplasma diversum*, até o momento encontrado somente em bovinos, é habitante dos tratos respiratório e genital, participando da etiologia de problemas reprodutivos como: vulvovaginite, salpingite, endometrite, abortamento, retenção de placenta, infertilidade em fêmeas e vesiculite seminal e epididimite em machos (DOIG *et al.*, 1981a; THORNBURGH, 1982; KIRKBRIDE, 1987; EAGLESOME *et al.*, 1992). Esta espécie também foi citada como responsável por morte neonatal (MILLER *et al.*, 1983; RUHNKE, 1984).

Casos de Vulvovaginite Granular aguda por *U. diversum* têm sido associados à severa queda nas taxas de concepção no primeiro serviço em rebanhos que utilizam inseminação artificial. O agente pode ser

introduzido no útero pelo uso de sêmen contaminado ou ser carreado ao longo da cervix pela pipeta de inseminação (KIRKBRIDE, 1987).

A aderência dos microrganismos interfere na espermatogênese, transporte espermático, capacitação e fecundação. Além disso, espermatozoides 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).

As vias de eliminação de micoplasmas e ureaplasmas são secreções orgânicas, especialmente sêmen, mucos prepucial e vaginal, secreção conjuntival e leite. A transmissão ocorre por contágio indireto, por meio de equipamentos contaminados como pipetas de inseminação e teteiras de ordenha. No entanto, a principal forma de transmissão é o contágio direto pelo coito, onde touros infectados disseminam os agentes através da monta natural ou inseminação artificial (KIRKBRIDE, 1987; BRITTON *et al.*, 1988; MILLER *et al.*, 1994).

A cavidade prepucial parece ser o principal ponto para a contaminação do sêmen em touros quando a colheita de sêmen é efetuada com vagina artificial. Entretanto, foi demonstrado que em alguns animais a uretra também é altamente colonizada, sugerindo que os procedimentos instituídos para reduzir o número de organismos no prepúcio, podem não ser totalmente efetivos para eliminar a contaminação do sêmen (DOIG, 1981a).

A transmissão placentária de *Mycoplasma* foi descrita por STONE *et al.* (1969). Posteriormente, foi relatado o isolamento de *Mycoplasma* spp. em fetos abortados e anexos fetais (TRICHARD & JACOBSZ, 1985; KAPOOR *et al.*, 1989).

Usualmente os micoplasmas e ureaplasmas são introduzidos nas propriedades rurais através da compra de animais em rebanhos infectados ou quando do retorno à propriedade de animais que adquiriram a infecção em exposições e leilões (HUFFMAN *et al.*, 1985).

O potencial para difusão internacional destes agentes através da comercialização de material genético deve ser sempre considerado (RUHNKE & ROSENDAL, 1994).

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 espermatozoide ao choque causado pelo congelamento e descongelamento. Infecções dos testículos ou epidídimo podem resultar em alterações morfológicas (ultra-estrutural) no espermatozoide e a motilidade pré-congelamento pode diminuir (KIRKBRIDE, 1987).

PANANGALA *et al.* (1981) constataram que após 72 horas de contato com esperma, o *M. bovis genitalium*

adere-se ao acrossomo e à cauda dos espermatozoides, provocando a sua imobilização.

JURMANOVA & STERBOVA, (1977) constataram a existência de associação significativa entre baixa motilidade dos espermatozoides e a contaminação do sêmen por *Mycoplasma* spp., caracterizada por redução da motilidade (ao redor de 60%) e viabilidade de espermatozoides de bovinos como consequência da adsorção de micoplasmas ou ureaplasmas.

A associação entre aderência microbiana e motilidade espermática foi observada em homens inférteis, onde infecções genitais por *Ureaplasma urealyticum* têm sido relacionadas à diminuição de motilidade espermática e anormalidades citológicas. Os ureaplasmas são encontrados principalmente no colo espermático e quando a infecção é debelada, observa-se aumento na motilidade e diminuição da porcentagem de anomalias espermáticas. É possível que em condições naturais, o contato entre esperma e micoplasma não ocorra após a ejaculação, mas no epidídimo. A aderência ao esperma pode interferir com o processo essencial de maturação (FRIBERG, 1980).

Quando o *M. bovis genitalium* adere-se aos espermatozoides bovinos e anticorpos contra antígenos de micoplasmas estão presentes, a aglutinação espermática pode ocorrer (TIMONEY *et al.*, 1998). A adição de suspensão de *Mycoplasma bovis genitalium* ao sêmen bovino determinou uma redução na motilidade dos espermatozoides após 48 à 72 horas, e este efeito foi dose dependente (DOIG & RUHNKE, 1986). Algumas estirpes de *M. bovis genitalium* parecem ser capazes de suprimir a motilidade espermática associado ou não à evidências clínicas de doença.

A presença de sulfoglicolipídicos na membrana espermática foi associada à um receptor específico para *U. diversum* isolado de bovinos (LINGWOOD *et al.*, 1990).

### Diagnóstico

Os métodos utilizados para a detecção de *Mycoplasma* spp. e *U. diversum* estão restritos a técnicas de isolamento e identificação sorológica das estirpes isoladas (Imunoperoxidase, Imunofluorescência e ELISA). No entanto, estes procedimentos são demorados, de difícil padronização e dispendiosos (KUPPEVELD *et al.*, 1992; SIMECKA *et al.*, 1992). Apesar do isolamento ser o método de escolha, pois possibilita a visualização dos microrganismos, o mesmo é afetado pela presença de bactérias oportunistas usualmente presentes quando das colheitas efetuadas a campo. O tempo decorrido entre a colheita e o processamento laboratorial, também pode afetar a viabilidade dos microrganismos, o que prejudica o cultivo em meios artificiais. Estes fatores têm determinado a

implementação de técnicas mais rápidas, sensíveis e específicas (CARDOSO *et al.*, 2000).

O isolamento bacteriológico permite a detecção de diferentes estirpes de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma diversum*. No entanto, diversas estirpes de *Mycoplasma* isoladas não podem ser diferenciadas em espécie através desta técnica, já que a morfologia colonial é muito semelhante. O resultado final é considerado positivo para o gênero *Mycoplasma*, quando não há disponibilidade para tipificação sorológica ou molecular das estirpes. Já para a espécie *Ureaplasma diversum*, essa tipagem não se torna necessária, por ser a única espécie de *Ureaplasma* encontrada em bovinos e sua caracterização através da morfologia colonial ser patente.

As técnicas moleculares, como a PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), têm sido um grande avanço para o diagnóstico das micoplasmoses, pois além de detectarem estirpes inviáveis para o isolamento, requerem pequenas quantidades de DNA presentes na amostra clínica a ser analisada (ANDRADE, 1993; FARAH, 1997; GHADERSOHI *et al.*, 1997).

A principal vantagem da PCR é a possibilidade de ser realizado o diagnóstico em pequenas quantidades de DNA. Embora rotineiramente seja utilizado 0,5 µg de DNA genômico na amostra clínica, a técnica pode ser eficaz, mesmo se realizada a partir de uma molécula de DNA proveniente de uma única célula. A possibilidade da amplificação de um gene específico, como os genes de uma bactéria, por meio da PCR, poderá vir a dispensar os métodos diagnósticos clássicos até então utilizados (FARAH, 1997). Esta técnica poderá ser de grande utilidade para o diagnóstico das micoplasmoses, pois cobre as falhas existentes nos métodos convencionais de cultivo bacteriano, através da detecção de células viáveis ou inviáveis, em menor tempo. Estas características poderão agilizar o diagnóstico laboratorial, possibilitando ao clínico de campo a rápida implantação de uma estratégia para o controle da doença.

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).

CARDOSO, (1998) empregou a técnica de PCR, com *primers* obtidos da região 16S rRNA e condições de especificidade, 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 equinos, 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 (SPERCSEY *et al.*, 2002).

### Tratamento e controle

A ausência de recursos imunoprofiláticos efetivos contra as micoplasmoses genitais, determina que o controle destas enfermidades dependa de medidas de higiene e de procedimentos sanitários, incluindo-se a segregação de animais infectados (PATHAK & GARG, 1988). Após implementação destas medidas, procedimentos que minimizem a transmissão dos agentes devem ser adotados. O uso de pipetas de inseminação duplas e/ou de preservativos de inseminação têm sido preconizados (EAGLESOME *et al.*, 1992)

Os antibióticos têm sido adicionados aos diluentes de sêmen desde a década de 40 e nesse período, foram capazes de destruir *Campylobacter* no sêmen. Atualmente, esta bactéria passou a ser rara e o processo de congelamento de sêmen está disseminado em todo o mundo, no entanto, a estreptomomicina e a penicilina são utilizadas (PAREZ, 1985).

A preocupação com o controle sanitário de partidas de sêmen industrializado, nas centrais de inseminação, tem gerado pesquisas onde novas combinações de antibióticos têm sido testadas com a intenção de controlar *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* e *Haemophilus somnus*. A associação lincomicina, espectinomicina, tilosina e gentamicina adicionados ao sêmen fresco e também a diluidores tendo o leite não glicerinado como base e, em gema de ovo, foi capaz de controlar *M. bovis*, *M. bovis genitalium* e *Ureaplasma* spp. (SHIN *et al.*, 1988). A lincospectina e a espectinomicina foram adicionados aos conservantes para controlar micoplasmas; esta mesma combinação não se apresentou efetiva contra *Ureaplasma* spp. (BALL *et al.*, 1987).

VISSER *et al.* (1995) testaram duas combinações de antibióticos em sêmen congelado contra *Haemophilus somnus*, *Campylobacter fetus* spp. *venerealis*, *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum*. A combinação de diferentes concentrações de gentamicina, tilosina, lincomicina e espectinomicina foi comparada com penicilina, estreptomomicina, lincomicina e espectinomicina (PELE). A combinação PELE reduziu significativamente o nível de *U. diversum* após oito dias de congelamento, porém, contra *M. bovis*, nenhuma das duas combinações apresentou resultados significantes.

A suplementação de conservantes com minociclina para sêmen a base de leite tem sido favorável para o

controle de micoplasmas e ureaplasmas, sem prejudicar a qualidade espermática (DOIG, 1981a).

A combinação de lincomicina, espectinomicina e tilosina foi ativa contra ureaplasmas *in vitro* (TRUSCOTT & RUHNKE, 1984), assim como o tiamulin foi efetivo no controle de ureaplasma em sêmen (AHMAD *et al.*, 1987).

A campo, touros têm sido tratados para micoplasma e ureaplasma com descanso sexual e lavados prepuçiais, com a intenção de diminuir a possibilidade de transmissão de micoplasmas e ureaplasma e de melhorar as condições de fertilidade (DOIG, 1981a). Entretanto, até o momento, não é conhecido um tratamento efetivo para eliminar o estado de portador de micoplasmas e ureaplasmas em touros (DOIG, 1981a; KIRKBRIDE, 1987).

Para a implementação de métodos apropriados de tratamento é necessário o conhecimento das características da doença. Desta forma, a falta de dados sobre as micoplasmoses da reprodução pode estar prejudicando o seu controle no país. Os clínicos de campo praticamente desconhecem a presença destes microrganismos nos rebanhos brasileiros, fato que pode estar contribuindo para a sua manutenção nos plantéis.

As formas de controle indicadas para as micoplasmoses reprodutivas são a antibioticoterapia local, preventiva para as infecções genitais nas fêmeas e sistêmica para os casos de infecções em machos. A ausência de parede celular, característica dos *Mycoplasmatales*, indica a utilização de antibióticos cuja ação seja sobre a síntese protéica. As drogas preconizadas têm sido tartarato de tilosina, oxitetraciclina e fumarato de tiamulin (TRUSCOTT *et al.*, 1975; ALLAN & PIRRIE, 1981; HOLZMANN *et al.*, 1984; PICARD *et al.*, 1984; STIPKOVITS *et al.*, 1984; LORTON *et al.*, 1988). O enrofloxacin foi utilizado com bons resultados práticos (MILLER *et al.*, 1994), porém a sua eficácia específica contra os micoplasmas que habitam o sistema urogenital de bovinos e contra *Ureaplasma diversum* ainda não foi comprovada.

Tratamentos adequados para as condições brasileiras ainda estão sendo testados. Novas pesquisas devem ser realizadas para elucidar os antibióticos e/ou quimioterápicos mais adequados às estirpes bacterianas circulantes no país.

Os antibióticos rotineiramente adicionados aos diluentes (penicilina e estreptomomicina) não são efetivos para o controle de micoplasmas no sêmen. TRUSCOTT (1983) examinou a atividade de vários outros antibióticos e observou que a minociclina foi efetiva contra *Ureaplasma*, enquanto que associação de lincomicina (0,3 mg/mL) e espectinomicina (0,6 mg/mL) foi efetiva contra *Mycoplasma*, sendo que os resultados podem ser prejudicados pelo tempo necessário de contato entre os antibióticos e o sêmen (15 min. a 35° C) e a influência do diluente, já que a minociclina é efetiva somente em diluentes a base de leite (PAREZ, 1985).

AYLING *et al.* (2000), mostraram uma maior atividade *in vitro* de danofloxacin contra estirpes de campo de *Mycoplasma bovis* que florfenicol, oxitetraciclina, espectinomomicina e tilmicosin.

STIPKOVITS *et al.* (2001), testaram a valnemulina na forma de premix, uma pleuromutilina com excelente ação sobre micoplasmas, em animais de campo portando infecção respiratória onde *Mycoplasma bovis* foi detectado em 80% dos casos. O resultado no grupo tratado foi ganho de peso mais rápido, menores porcentagens de infecção por *Mycoplasma*, menores taxas de sintomas respiratórios além de menor requerimento de tratamentos com outros antibióticos.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFSHAR, A. & EAGLESOME, M.D. Viruses associated with bovine semen. *Vet. Bull.*, v.60, p.689-697, 1990.
- AHMAD, K.; FOOTE, R.H.; KAPROTH, M. Post-thaw motility, acrossomal integrity and fertility of antibiotic-treated frozen bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.27, p.923-930, 1987.
- ALBERTSEN, B.E. Pleuropneumonia-Like organisms in the semen of Danish artificial insemination bulls. *Nord. Veterinaarmed.*, v.7, p.169-201, 1955.
- ALLAN, E.M. & PIRIE, H.M. *In vitro* activity of tiamulin against bovine respiratory tract mycoplasmas. *Res. Vet. Sci.*, v.31, p.174-176, 1981.
- ANDRADE, L.E.C. Princípios de biologia molecular e suas aplicações em medicina. *Rev. Assoc. Méd. Bras.*, v.39, p.175-86, 1993.
- AYLING, R.D.; BAKER, S.E.; PEEK, M.L.; SIMON, A.J.; NICHOLAS, R.A.J. Comparison of *in vitro* activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Rec.*, v.146, p.745-747, 2000.
- BALL, H.J.; LOGAN, E.F.; ORR, W. Isolation of mycoplasma from bovine semen in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, v.121, p.322-324, 1987.
- BERGEY, D.H.; HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; BERGY, D. *BERGEY'S Manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787p.
- BIELANSKI, A. & DUBUC, C. *In vitro* fertilization and culture of ova from heifers infected with bovine herpesvirus-1 (BHV-1). *Theriogenology*, v.41, p.1211-1217, 1994.
- 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* *Mycoplasma* spp. em casos de Vulvite Granular Bovina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, n.2, p.172-173, 1997.
- CARDOSO, M.V. *Ureaplasma diversum e vulvovaginite granular bovina (VVG), uma provável associação. Diagnóstico através de técnicas de cultivo e reação da polimerase em cadeia*. São Paulo: 1998. 62p. [Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].
- 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. *Vet. Microbiol.*, v.72, p.241-250, 2000.
- DOIG, P.A. Bovine genital mycoplasmosis. *Can. Vet. J.*, 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. *Am. Assoc. Bovine Pract. Proc.*, v.13, p.127-136, 1981b.
- DOIG, P.A. & RUHNKE, H.L. Effects of Ureaplasma infection on bovine reproduction. In: MORROW, D. A. (Ed.). *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. p.282-187.
- EAGLESOME, M.D.; GARCIA, M.M.; STEWART, R.B. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part II. *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma* spp. and *Ureaplasma* spp., *Chlamydia*; Pathogens and semen contaminants; treatment of bull semen with antimicrobial agents. *Vet. Bull.*, v.62, p.887-910, 1992.
- EICHWALD, C.; ILLNER, F.; TROLLDENIER, H. (Ed.). *Mycoplasmosis de los animales*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1973. 291 p.
- FARAH, S.B. *DNA segredos e mistérios*. São Paulo: Sarvier, 1997. 276p.
- FISH, N.A.; ROSENDAL, S.; MILLER, R.B. The distribution of Mycoplasmas and Ureaplasmas in the genital tract of normal artificial insemination bulls. *Can. Vet. J.*, v.26, p.13-15, 1985.
- FLATSCHER, J. & HOLMANN, A. Genital diseases in bulls: importance for artificial insemination - control measures. In: CONFERENCE OF THE REGIONAL COMMISSION FOR EUROPE, 11., 1981, Vienna. *Proceedings*. Vienna: Office International des Épizooties, 1981. p.393-403.
- FRIBERG, J. Mycoplasmas and ureaplasmas in infertility and abortion. *Fertil. Steril.*, v.22, n.4, p.351-359, 1980.
- GHADERSOHI, A.; COELEN, R.J.; HIRST, R.G. Development of specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.*, v.56, p.87-98, 1997.
- GOURLAY, R.N. Significance of Mycoplasma infection in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 163, n. 7, p. 905 - 909, 1973.
- HALL, C.E. & MCENTEE, K. Reduced post-thawing survival of sperm in bull with Mycoplasmal vesiculitis (Brief Communication). *Cornell Vet.*, v.71, p.111-112, 1981.
- HOLZMANN, A.; LABER, G.; GUMHOLD, G. Tiamulin, a new antibiotic for eliminating mycoplasmas from bovine semen 1. Investigations on spermatozoal toxicity. *Theriogenology*, v.22, n.3, 1984.
- HUFFMAN, E.M.; CHRISTENSEN, V.; HRD, D.; JASPER, D. Epidemiology of bovine genital ureaplasma infection. *Proc. Soc. Theriogenology*, p. 67-71, 1985.
- JASPER, D.E. Bovine mastitis due to mycoplasma. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, v.6, p.801-807, 1987.
- JURMANOVA, K. & STERBOVA, J. Correlation between impaired spermatozoan motility and mycoplasma finding in bull semen. *Vet. Rec.*, v.100, p.157-158, 1977.
- KAPOOR, P. K.; GARG, D. N.; MAHAJAN, S. K. Isolation of *Mycoplasma* subsp. *mycoides* (LC variant, Y-goat) from naturally aborted bovine fetuses. *Theriogenology*, v.32, n.4, p.683-691, 1989.

- KIRKBRIDE, C.A. Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.3, p.575-591, 1987.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p.2606-2615, 1992.
- LE GRAND, D.; POUMARAT, F.; MARTEL, J.L. Infectious genital disease by *Ureaplasma diversum*, investigations on bovine in France. *Vet. Res.*, v.26, n.1, p.11-20, 1995.
- LIBERAL, M.H.T.; ROMININ, P.C.; VOLLU, E.W. Presença de *Mycoplasma spp.* em pulmão de bezerro de até um ano de idade. *Comun. Téc. PESAGRO*, Rio de Janeiro, v.8, n.1/3, 1982.
- LINGWOOD, C.A.; QUINN, P.A.; WLANSKY, S. Common sulfoglycolipid receptor for mycoplasmas involved in animal and human infertility. *Biol. Reprod.*, v.43, p.694-697, 1990.
- LORTON, S.P.; SULLIVAN, J.J.; BEAN, B.; KAPROTH, M.; KELLGREN, H.; MARSHALL, C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 3. evaluation of fertility. *Theriogenology*, v.29, n.3, p.609-614, 1988.
- MILLER, R.B.; RUHNKE, H.L.; DOIG, P.A.; POITRAS, B.J.; PALMER, N.C. The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows. *Theriogenology*, v.20, p.367-373, 1983.
- MILLER, R.B.; CHELMONSKA-SOYTA, A.; SMITS, B.; FOSTER, R.; ROSENDAL, S. *Ureaplasma diversum* as a cause of reproductive disease in cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.10, p.479-490, 1994.
- NASCIMENTO, E.R.; D'ANGELIS, F.H.F.; NASCIMENTO, M.G.F.; RESENDE, O.A. Isolamento de micoplasmas de touros provenientes de um rebanho com problemas reprodutivos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.20, n.4, p.158-160, 1998.
- NOCARD, E. & ROUX, E. La microbe de la peripneumonie. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, v.12, p.240-262, 1898.
- PANANGALA, V.S.; WINTER, A.J.; WUESINHA, A.; FOOTE, R.H. Decreased motility of bull spermatozoa caused by *Mycoplasma bovigenitalium*. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, n.12, p.2090-2093, 1981.
- PAREZ, M. The most important genital diseases of cattle (control, treatment and the hygiene of semen collection). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, v.4, n.1, p.69-87, 1985.
- PATHAK, R.C. & GARG, D.N. Immunology of bovine genital mycoplasmosis. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.*, v.4, p.218-245, 1988.
- PICARD, L.; SAUVAGEAU, R.; LAMOTHE, P. Influence de la tylosine soluble sur l'endomètre de la vache. *Can. Vet. J.*, v.25, p.300-301, 1984.
- PILAZEC, J. & TRUSZCZYNSKI, M. Affinity of microorganisms of the genus *Ureaplasma* to the reproductive organs of cattle. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.11, p.177-180, 1988.
- POUMARAT, F. & MARTEL, J. L. Mycoplasmoses bovines. *Rev. Med. Vet.*, v.138, n.10, p.799-806, 1987.
- POUMARAT, F.; LE GRAND, D.; BERGONIER, D. Propriétés générales des mycoplasmes et hypervariabilité antigénique. *Point Vet.*, v.28, p.13-20, 1997.
- QUINN, P.A.; SHEWCHUK, A.B.; SHUBER, J.; KIE, K.I.; RYAN, E.; SHEU, M.; CHIPMAN, M.L. Serologic evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in women with spontaneous pregnancy loss. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.145, p. 245-250, 1983.
- 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.
- RAZIN, S. & TULLY, J.G. Biochemical and enzymatic test in *Mycoplasma* identification. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G. (Eds.). *Methods in mycoplasmaology*. New York: Academic Press, 1983, v.1, p.335-389.
- ROSSINI, A.J. *Contribuição ao estudo de micoplasmose bovina: isolamento de Mycoplasma bovis em bezerros acometidos de pneumonia*. São Paulo: 1978. 49p. [Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo].
- 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.; PALMER, N.C.; DOIG, P.A.; MILLER, R.B. Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*. *Theriogenology*, v. 21, p.295-301, 1984.
- RUHNKE, H.L. & ROSENDAL, S. Useful protocols for diagnosis of animal mycoplasmas. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L. (Eds.). *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*, Iowa: Iowa State University Press, 1994. p.141-155.
- SHIN, S.; LEIN, D.H.; PATTEN, V. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of mycoplasmas, ureaplasmas, *Campylobacter fetus*, *Haemophilus somnus*. *Theriogenology*, v.29, p.577-591, 1988.
- SILVA, N. Detecção de patógenos no sêmen. Detecção de agentes patogênicos em sêmen bovino destinado a inseminação artificial. Disponível em: <http://biotecnologia.uol.com.br/edicoes/ed06.asp>. Acesso em: 14 mai 2003.
- 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. *Vet. Microbiol.*, v.87, p.119-129, 2002.
- STIPKOVITS, L.; VARGA, Z.; LABER, G.; BÖCKMANN, J. A comparison of the effect of tiamulin hydrogen fumarate and tylosin tartrate on mycoplasmas of ruminants and some animal ureaplasmas. *Vet Microbiol.*, v.9, p.147-153, 1984.
- STIPKOVITS, L.; RIPLEY, P.H.; VARGA, J.; PALFI, V. Use of valnemulin in the control of *Mycoplasma bovis* infection under field conditions. *Vet. Rec.*, v.148, p.399-402, 2001.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; THOMAS, M.; DAWSON, P.L. The isolation of T-mycoplasmas from the urogenital tract of bulls. *J. Med. Microbiol.*, v.2, p.527-533, 1969.

- TAYLOR-ROBINSON, D. & McCORMACK, W.M. The genital mycoplasmas. *New England J. Medicine*, v.302, p.1003-1010, 1063-1067, 1980.
- 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. *Arq. Univ. Fed. Rural 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. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.233-251, 2000.
- THORNBURGH, P.M. *Ureaplasma* association with bovine infertility in south-west Scotland. *Vet. Rec.*, v.18, n.111, p.519, 1982. Letters.
- TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. The Genera *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. (Eds.). *Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals*. London: Comstock Publishing Associates, 1998. p.295-317.
- TRICHARD, C.J.V. & JACOBSZ, E.P. Mycoplasmas recovered from bovine genitalia, aborted fetuses and placenta in the Republic of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.52, p.105-110, 1985.
- TRUSCOTT, R.B.; ONOVIRAM, O.; RUHNKE, H.L.; FISH, N.A.; BARKER, C.A. *In vitro* antimicrobial sensitivity of Mycoplasmas isolated from the bovine genital tract. *Can. J. Comp. Med.*, v.39, p.417-420, 1975.
- TRUSCOTT, R.B. & RUHNKE, H.L. The effect of antibiotics against bovine mycoplasmas and ureaplasmas. *Can. J. Comp. Med.*, v.48, p.171-174, 1984.
- TULLY, J.G.; BOVÉ, J.M.; LAIGRET, F.; WHITCOMB, R.F. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmatales* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*, and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v.43, p.378-385, 1993.
- VISSER, I.J.R.; LAAK, E.A.; JANSEN, H.B.; GERARD, O. The effect of two antibiotic mixtures on *Haemophilus somnus*, *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*, *Mycoplasma bovis* and *Ureaplasma diversum* in frozen bovine semen. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 30, p. 55-59, 1995.

Recebido em 18/3/04

Aceito em 18/8/04