

# Zastosowanie technik biologii molekularnej w diagnostyce zakażeń *Mycoplasma bovis* u bydła

EWELINA SZACAWA, MONIKA SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA,  
KRZYSZTOF NIEMCZUK, DARIUSZ BEDNAREK

Zakład Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 11.06.2013

Zaakceptowano 21.08.2013

Szacawa E., Szymańska-Czerwińska M., Niemczuk K., Bednarek D.

## Use of molecular techniques for the diagnosis of *Mycoplasma bovis* infections in cattle

### Summary

This article reviews the main molecular methods used for the diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. At present, infections with these bacteria constitute a major epidemiological and economical problem in many countries. Its control is difficult because of rising antibiotic resistance and a lack of commercially available vaccines used in specific immunoprophylaxis. *M. bovis* infection does not cause specific clinical signs, it is therefore important to have an effective and multidirectional diagnosis. Recently, among these are molecular techniques improving the reliability of the mycoplasmal examinations. One of the basic methods is polymerase chain reaction (PCR). Different variations of PCR are constantly enhanced to attain the highest sensitivity and specificity. There were also new methods applied based on other mechanisms. For example, there is the classic PCR modification which includes a highly discriminating identification system for PCR products based on denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) capable of detecting difficult to cultivate microbes (like most of the mycoplasmas) and bacteria from mixed cultures. Another advanced approach for the diagnosis of *M. bovis* infections is DNA microarray testing. *Mycoplasma* diagnosis using a few tests also gives more adequate data about the origin and specific properties of examined microorganisms.

**Keywords:** *Mycoplasma bovis*, PCR, DGGE, microarrays

Zakażenia mykoplazmowe u bydła stanowią obecnie w wielu krajach istotny problem epidemiologiczny i ekonomiczny. Wśród różnorodnych gatunków *Mycoplasma* spp. przyczyniających się do problemów w hodowli bydła ważną rolę odgrywa *Mycoplasma bovis*. Badania serologiczne przeprowadzone w Polsce w latach 2007-2010 wykazały, że odsetek zwierząt serododatnich wynosi 76,6% (4). Mykoplazmy należą do klasy *Mollicutes*, są najmniejszymi bakteriami, pozbawionymi ściany komórkowej, a do syntezy błony cytoplazmatycznej potrzebują steroli. Ze względu na potrzebę obecności w podłożu hodowlanym wielu specyficznych związków odżywczych oraz inhibitorów dla flory bakteryjnej kontaminującej ograniczającej wzrost mykoplazm, drobnoustroje te uważane są za organizmy szczególnie wymagające i trudne w hodowli. Ich genom jest niewielki i charakteryzuje się małą zawartością zasad G+C (21). W przypadku *M. bovis* ma ona dodatkowo charakterystyczny region kodujący białka vsp (variable surface proteins). Białka te umożliwiają osiąganie dużej zmienności antygenowej (5, 12, 13). Poszczególne szczepy *M. bovis* mają różne wersje białka vsp na powierzchni swoich komórek, a co za tym idzie – różnią się fenotypowo. Zmienność

ta pozwala im zasiedlać różnorodne środowiska oraz układy organizmu (20).

Zwalczanie zakażeń *M. bovis* współdziałających m.in. w rozwoju zespołu oddechowego bydła (BRD), zmianach zapalnych stawów, rogówki i spojówki, w powstawaniu ropni, w zapaleniach opon mózgowych i ucha jest utrudnione z powodu narastającej oporności na stosowane antybiotyki oraz brak komercyjnej szczepionki przeciwko tej bakterii (3, 18, 19). Z tego powodu niezwykle ważną jest wiarygodna diagnostyka tych zakażeń, co warunkuje następnie podjęcie właściwego ich leczenia (18). Objawy kliniczne u zwierząt w przebiegu infekcji *M. bovis* nie są patognomoniczne, z tego powodu zasadniczym elementem rozpoznania tych zakażeń są dodatkowe badania laboratoryjne. W celu wykrycia *M. bovis* w materiale biologicznym pochodzącym od bydła często stosuje się jednocześnie tradycyjne badania hodowlane, jak też testy immunoenzymatyczne (ELISA) (2). Dostępne są również inne metody pozwalające na identyfikację *M. bovis*, takie jak test zahamowania wzrostu, immunofluorescencji pośredniej oraz metoda immunohistochemiczna (8). Coraz częściej stosuje się techniki biologii molekularnej, które są szybkim i skutecznym narzędziem

diagnostycznym, pozwalającym potwierdzić lub wykluczyć obecność mykoplazm w badanym materiale biologicznym. Najczęściej stosowaną techniką jest metoda wykorzystująca reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), która umożliwia amplifikację genów specyficznych dla *M. bovis* (24). Badania oparte na tradycyjnych kryteriach identyfikacji mykoplazm, czyli ich zdolności do tworzenia charakterystycznych kolonii, biofilmu, rozkładu glukozy, hydrolizy argininy, wiązania dopełniacza oraz redukcji soli tetrazolowej często są niespecyficzne, czasochłonne i wymagają dużego nakładu pracy (16). Ponadto metoda hodowlana niesie ze sobą ryzyko kontaminacji badanych prób innymi drobnoustrojami. Jest jednak metodą wciąż stosowaną, ze względu na zadowalający poziom specyficzności i czułości ( $10^1$ - $10^2$  CFU/ml) oraz stosunkowo niskie koszty. Pozwala ona na wykrycie kilku gatunków *Mycoplasma* spp. w jednej próbce. Z kolei testy serologiczne wykrywające w surowicy oraz w mleku przeciwciała anty-*M. bovis* również posiadają pewne ograniczenia. M.in. z uwagi na fakt, że specyficzne przeciwciała odpornościowe pojawiają się dopiero 10-14 dni po zakażeniu, skuteczne badanie serologiczne możliwe jest dopiero po tym okresie (9, 22). Ponadto, często w przypadku metod serologicznych spotyka się wyniki fałszywie dodatnie, jako wynik reakcji krzyżowych z innymi gatunkami mykoplazm, podczas gdy techniki biologii molekularnej oparte na sekwencjonowaniu genów oraz reakcji łańcuchowej polimerazy cechują się optymalną specyficznością (1, cyt. za 9).

Reakcja PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla DNA *M. bovis* doskonalona była przez wiele lat, ponieważ pierwsze testy nie były dostatecznie specyficzne (9). Początkowo amplifikacja prowadzona była dla genu 16S rRNA, co skutkowało jednoczesnym powielaniem zarówno materiału genetycznego *M. bovis*, jak i *M. agalactiae* (18, 20). Jest to spowodowane tym, że obydwa gatunki są bardzo blisko spokrewnione ze sobą i wykazują 99% pokrewieństwo w sekwencji genów 16S rRNA (17). Geny te różnią się między *M. bovis* i *M. agalactiae* tylko 8 nukleotydami (15). Identyfikacja gatunków *Mycoplasma* spp. na podstawie genu 16S rRNA za pomocą PCR napotyka na trudności, ponieważ gen ten zawiera niewiele specyficznych dla konkretnego gatunku fragmentów. Identyfikacja innych genów, które byłyby przydatne do różnicowania gatunków, jest utrudniona, ponieważ genomy nie wszystkich mykoplazm zostały do tej pory zsekwencjonowane (16). Ghadersohi i wsp. opracowali metodę PCR służącą odróżnieniu *M. bovis* od pozostałych mykoplazm i innych bakterii w próbkach mleka. Opracowana przez nich metoda opiera się na użyciu dwóch starterów (Mb1 i Mb2). Na podstawie dotychczasowych badań potwierdzono, że metoda ta jest wysoce specyficzna i dostatecznie czuła, pozwala bowiem wykryć już 20 CFU/ml próbki. Wymaga ona jednak dalszych badań, dotychczasowe testy wykonano bowiem z wykorzystaniem jedynie dwóch szczepów

*M. bovis* (9). W późniejszym czasie Hayman i Hirst opracowali dodatkowy, wiodący starter, w celu wzmocnienia czułości i reprodukcyjności testu specyficznego dla *M. bovis* opracowanego przez Ghadersohi'ego i wsp. Próg detekcji dla tak przygotowanego semi-nested PCR wynosi 10-100 CFU/ml próbki (10). Najbardziej wiarygodnym testem PCR służącym do wykrywania sekwencji DNA specyficznej dla *M. bovis* jest reakcja amplifikacji fragmentu genu *uvrC*. Badania prowadzone przez Subramaniam i wsp. potwierdzają, że obszar restrykcyjny genu *uvrC* *M. bovis* jest konserwatywny (24). Z kolei badania wykonane przez Thomasa i wsp. dowodzą, że pomimo genetycznej zmienności mykoplazm gen *uvrC* *M. bovis* jest stabilny i odporny na mutacje (26). Jeszcze nowszym podejściem do stworzenia konserwatywnego i wysoce specyficznego PCR dla *M. bovis* jest wykorzystanie w amplifikacji genu kodującego zmienne białko powierzchniowe (Vsp) (25). Antygeny powierzchniowe Vsp charakteryzują się dużą zmiennością fenotypową. Mają obszerną domenę powtarzającą się przez całą długość cząsteczki oraz region wspólnych epitopów. Miejsce zakotwiczenia membrany przez domenę N-kończową i region C-końcowy znajduje się na całej długości cząsteczki Vsp (12-14). Do tej pory scharakteryzowano 3 białka Vsp: VspA, VspB, VspC (5).

Kilka lat temu opracowano reakcję PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR; qPCR). Metoda ta ma większą przewagę nad klasyczną reakcją PCR z uwagi na lepszą wydajność, ponieważ umożliwia zbadanie większej ilości próbek jednocześnie. Dzięki temu, że nie ma konieczności otwierania probówek z produktem PCR w celu wizualizacji wyniku, cechuje się ona mniejszą podatnością na krzyżową kontaminację (6). Końcowy wynik może być przedstawiony w sposób ilościowy dzięki zastosowaniu znakowanych fluorescencyjnie sond (np. TaqMan), które rozpoznają specyficzną sekwencję DNA w regionie znajdującym się pomiędzy dwoma starterami i powodują fluorescencję każdej nowo otrzymanej sekwencji (23). Początkowo do reakcji qPCR używano starterów zlokalizowanych zarówno w konserwatywnych, jak i zmiennych regionach genu kodującego 16S rDNA, amplifikowany produkt reakcji ma 190 pz. Ten fragment DNA jest charakterystyczny zarówno dla *M. bovis*, jak i dla *M. agalactiae*, *Staphylococcus aureus* oraz *Streptococcus agalactiae*, jednak przyłączenie sondy specyficznej dla genu 16S rDNA *M. bovis* daje możliwość detekcji genu charakterystycznego dla tej mykoplazmy (6). Z najnowszych badań wynika, że do wykrywania fragmentów DNA specyficznych dla *M. bovis* u bydła stosuje się startery powodujące amplifikację regionu *oppD*, genu kodującego permeazę oligopeptydów oraz białka transportowe należące do rodziny ABC. Przy wykorzystaniu tych starterów uzyskiwany jest produkt reakcji o wielkości 71 pz (23). Reakcja qPCR może również bazować na amplifikacji genu *uvrC*, który jest również specyficzny dla tej

mykoplazmy, a w wyniku tej reakcji powstaje produkt o wielkości 112 pz (7).

Inną metodą, która jest wysoce specyficzna oraz pozwala na jednoczesną identyfikację wszystkich dotychczas poznanych gatunków mykoplazm występujących u bydła, jest elektroforeza w gradiencie stężeń czynnika denaturującego (denaturing gradient gel electrophoresis – DGGE). Jest to technika polegająca na spowolnieniu migracji fragmentów DNA poprzez użycie czynnika denaturującego w różnych stężeniach, a przez to stworzenie możliwości ich lepszej segregacji w żelu. Ze względu na różnice w wielkości fragmentów DNA, zatrzymują się one na różnych wysokościach ścieżki na żelu, tworząc tzw. „fingerprinting”, na podstawie którego możliwe jest różnicowanie szczepów w obrębie poszczególnych gatunków mykoplazm. McAuliffe i wsp. opracowali PCR-DGGE na bazie regionu V3 genu 16S rRNA, która pozwala na identyfikację 32 gatunków mykoplazm jednocześnie. Do PCR użyto uniwersalnych starterów dla regionu V3 16S rDNA. Z powodu trudności w rozróżnieniu niektórych gatunków mykoplazm np. u małych przeżuwaczy, można zastosować jeszcze bardziej specyficzny starter, który powoduje amplifikację DNA z regionu 16S-23S. Są to jednak dopiero pierwsze, nie do końca jeszcze udokumentowane próby wykrywania i różnicowania mykoplazm zwierzęcych za pomocą jednego testu. Nie zmienia to jednak faktu, że DGGE (dla genu 16S rRNA) pozwala na wykrywanie prawie wszystkich mykoplazm występujących u zwierząt gospodarskich. Metoda ta jest przydatna do identyfikacji bakterii trudnych w hodowli, jakimi są mykoplazmy, a w szczególności tych szczepów *M. agalactiae* i *M. bovis*, których różnicowanie metodą hodowlaną czy też serologiczną jest niepewne. Ważne jest, że DGGE nie ogranicza się tylko do identyfikacji szczepów już znanych, bowiem szczepy mykoplazm jeszcze niezidentyfikowane mogą być przy jej zastosowaniu również wykryte. Dodatkową zaletą DGEE jest możliwość detekcji nawet pojedynczych mutacji w badanym genie. Niedoskonałością metody jest to, że niektóre szczepy bakterii z klasy *Mollicutes* o zbliżonych genotypach do badanych przez nas drobnoustrojów mogą niekiedy dawać również wynik dodatni (17). Efekt ten można zniwelować przez zwiększenie ilości zawiesiny bakteryjnej w badanej próbce (16). Postępy w poszukiwaniu starterów, które mogłyby udoskonalić reakcję powielania fragmentów DNA charakterystycznych dla mykoplazm, pozwoliły zwiększyć specyficzność badań dla *Mycoplasma* spp. poprzez użycie startera wiodącego – uniwersalnego dla wszystkich bakterii oraz drugiego – odwrotnego, specyficznego dla klasy *Mollicutes*. Dodatkowo, aby zminimalizować amplifikację DNA bakterii spoza klasy *Mollicutes*, temperaturę przyłączania starterów zwiększono z 55°C do 56°C, co pozwoliło upewnić się, że powielone DNA bakterii należy wyłącznie do bakterii klasy *Mollicutes*. W efekcie możemy wykryć

67 gatunków mykoplazm zwierzęcych i ludzkich. Metoda ta pozwala również na identyfikację bakterii w infekcjach mieszanych. Modyfikacje wcześniej opisanej metody pozwalają na wykonanie badań metodą DGGE bezpośrednio z wymazów i wycinków tkanek, bez potrzeby wcześniejszego namnażania drobnoustrojów na odpowiednich podłożach. Modyfikacje te pozwalają na skrócenie czasu oczekiwania na wynik badania z 1-2 tygodni do 1 dnia. Metoda DGGE pozwala na identyfikację wszystkich 13 gatunków mykoplazm bydłowych. Zauważono jednak, że w przypadku *Mycoplasma bovis*, *M. canadense* oraz *M. verecundum* uzyskiwane produkty amplifikacji mają zbliżoną do siebie liczbę par zasad. Zaletą metody DGGE jest możliwość detekcji nowych gatunków mykoplazm, dla których nie odkryto jeszcze specyficznych starterów do reakcji PCR (17).

Reakcje łańcuchowej polimerazy oraz DGGE są metodami o wysokiej czułości i specyficzności, ale jeszcze lepszymi parametrami cechują się techniki mikromacierzowe. Ich zaleta wynika z faktu, że umożliwiają przeanalizowanie dużej ilości fragmentów DNA umieszczonych na macierzy. Poza tym, pozwalają one na identyfikację wielu drobnoustrojów chorobotwórczych, dostarczając przy tym kompletny profil genetyczny charakterystyczny dla nich. Umożliwiają też identyfikację podgatunków i biotypów oraz zbadanie obecności lub braku genów kodujących czynniki zjadliwości oraz antybiotykooporności. Wykonanie badania z użyciem mikromacierzy DNA jest mniej pracochłonne niż badanie metodami tradycyjnymi. Cechują się one dużą rozdzielczością, dzięki czemu obecność lub brak wielu genów mogą być badane jednocześnie (27). Odkrycie tej metody badawczej jest niezwykle cenne, ponieważ pozwala w jednym czasie uzyskać informacje na temat zakażeń wieloma gatunkami bakterii, wystąpienia koinfekcji np. dwoma lub więcej gatunkami mykoplazm oraz obecności atypowych szczepów (www.plosone.org 2012, 7, e33237, 1-10). Jedną z pierwszych macierzy, jaka dawała możliwość wykrycia DNA *M. bovis*, był biochip służący do identyfikacji DNA 7 najczęściej występujących patogenów powodujących *mastitis* u krów. Poza *M. bovis* są to: paciorkowce – *Streptococcus bovis*, *S. uberis*, *S. agalactiae* i *S. dysgalactiae*, a także *Corynebacterium bovis* i *Staphylococcus aureus* (11). Z kolei Schnee i wsp. opisują opracowaną przez nich mikromacierz zdolną do wykrycia 37 gatunków należących do klasy *Mollicutes*, w tym: 31 gatunków rodzaju *Mycoplasma*, 3 gatunków rodzaju *Acholeplasma* oraz 3 gatunków rodzaju *Ureaplasma* (www.plosone.org 2012, 7, e33237, 1-10). Natomiast Tonelli i wsp. opracowali mikromacierz zawierającą sekwencje genowe 55 bakterii należących do rodzajów: *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma* i *Ureaplasma*. Opracowana przez nich mikromacierz służy głównie identyfikacji mykoplazm z grupy *mycoides* i skринingowi *Mycoplasma* spp. Autorzy zaznaczają, że mikromacierz wymaga udosko-

nalenia poprzez dodanie większej ilości specyficznych sekwencji DNA *M. agalactiae*, *M. alkalescens*, *M. arginini*, *M. bovis* i innych mykoplazm z grupy *mycoides*. Korzystne byłoby umieszczenie na mikromacierzy dodatkowych sekwencji genów odpowiedzialnych za czynniki wirulencji i patogenności (27).

Wiarygodna diagnostyka zakażeń *M. bovis* u bydła ma charakter kompleksowy i jest związana z zastosowaniem kilku metod. Różnice w detekcji zakażeń tym drobnoustrojem za pomocą różnych testów są powodowane wieloma czynnikami i właściwościami materiału biologicznego oraz zdolnością przeżycia drobnoustrojów w badanym materiale. Ponieważ nie zawsze wykrycie przeciwciał anti-*M. bovis* oznacza wystąpienie zakażenia, ważne jest, aby diagnostyka była wielokierunkowa. Wstępne, przesiewowe badania bazujące na analizie miana przeciwciał pozwalają jedynie na stwierdzenie, że zwierzę miało kontakt z patogenem, ale nie dają ostatecznej odpowiedzi, czy aktualnie mamy do czynienia z infekcją. Ważnym etapem diagnostycznym jest wykonanie badań molekularnych, dzięki którym możemy potwierdzić lub wykluczyć wyniki badań serologicznych i hodowlanych. Prowadzenie badań za pomocą kilku metod, opierających się na różnych technikach, daje możliwość uzyskania wiarygodnej informacji na temat pochodzenia i rozprzestrzeniania się badanego mikroorganizmu oraz jego właściwości antygenowych i chorobotwórczych.

### Piśmiennictwo

1. Alberti A., Addis M. F., Chessa B., Cubeddu T., Profiti M., Rosati S., Ruiu A., Pittau M.: Molecular and antigenic characterization of *Mycoplasma bovis* strain causing an outbreak of infectious keratoconjunctivitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006, 18, 41-51.
2. Ball H. J., Finlay D., Reilly G. A. C.: Sandwich ELISA detection of *Mycoplasma bovis* in pneumonic calf lungs and nasal swabs. *Vet. Rec.* 1994, 135, 531-532.
3. Ball H. J., Nicholas R. A. J.: *Mycoplasma bovis*-associated disease: Here, there and everywhere. *Vet. J.* 2010, 186, 280-281.
4. Bednarek D., Ayling R. D., Nicholas R. A. J., Dudek K., Szymańska-Czerwińska M.: Serological survey to determine the occurrence of respiratory *Mycoplasma* infections in the Polish cattle population. *Vet. Rec.* 2012, 171, 45.
5. Behrens A. M., Heller H., Kirchhoff H., Yagev D., Rosengarten R.: A family phase and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* 1994, 62, 5075-5084.
6. Cai H. Y., Bell-Rogers P., Parker L., Prescott J. F.: Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2005, 17, 537-545.
7. Clothier K. A., Jordan D. M., Thompson C. J., Kinyon J. M., Frana T. S., Strait E. L.: *Mycoplasma bovis* real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2010, 22, 956-960.
8. Dudek K., Bednarek D., Szymańska-Czerwińska M.: Występowanie i diagnostyka zakażeń mykoplazmowych u bydła. *Lecznica Dużych Zwierząt* 2012, 7, 21-24.
9. Ghadersohi A., Coelen R. J., Hirst R. G.: Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* 1997, 56, 87-98.
10. Hayman B., Hirst R.: Development of a semi-nested PCR for the improved detection of *Mycoplasma bovis* from bovine milk samples and mucosal samples. *Vet. Microbiol.* 2003, 91, 91-100.
11. Lee K.-H., Lee J.-W., Wang S.-W., Liu L.-Y., Lee M.-F., Chuang S.-T., Shy Y.-M., Chang C.-L., Wu M.-C., Chi C.-H.: Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008, 20, 463-471.
12. Lysnyansky I., Ron Y., Yagev D.: Juxtaposition of an active promoter to vsp genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in *Mycoplasma bovis*. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 5698-5708.

13. Lysnyansky I., Rosengarten R., Yagev D.: Phenotyping switching of variable surface lipoprotein in *Mycoplasma bovis* involves high-frequency chromosomal rearrangements. *J. Bacteriol.* 1996, 178, 5395-5401.
14. Lysnyansky I., Sachse K., Rosenbusch R., Levisohn S., Yagev D.: The vsp locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features. *J. Bacteriol.* 1999, 181, 5734-5741.
15. Mattsson J. G., Guss B., Johansson K. E.: The phylogeny of *Mycoplasma bovis* as determined by sequence analysis of the 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994, 115, 325-328.
16. McAuliffe L., Ellis L. J., Ayling R. D., Nicholas R. A. J.: Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 4844-4847.
17. McAuliffe L., Ellis R. J., Lawes J. R., Ayling R. D., Nicholas R. A. J.: 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.* 2005, 54, 731-739.
18. Nicholas R. A. J.: The other *M. bovis*: *Mycoplasma bovis*. *UK Vet.* 2010, 15, 1-3.
19. Nicholas R. A. J., Ayling R. D.: *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis and control. *Res. Vet. Sci.* 2003, 74, 105-112.
20. Pettersson B., Uhlen M., Johansson K.-E.: Phylogeny of some *Mycoplasmas* from ruminant based on 16S rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996, 46, 1093-1098.
21. Razin S., Yagev D., Naot Y.: Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 64, 1094-1156.
22. Sachse K., Pfützner H., Hotzel H., Demuth B., Heller M., Berthold E.: Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 1993, 12, 571-580.
23. Sachse K., Salam H. H., Diller R., Schubert E., Hoffmann B., Hotzel H. S.: Use of a novel real-time PCR technique to monitor and quantitate *Mycoplasma bovis* infection in cattle herds with mastitis and respiratory disease. *Vet. J.* 2010, 186, 299-303.
24. Subramaniam S., Bergonier D., Poumarat F., Capaul S., Schlatter Y., Nicolet J., Frey J.: Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the uvrC genes by PCR. *Mol. Cell. Probes.* 1998, 12, 161-169.
25. Tenk M., Bálint A., Stipkovits L., Biró J., Dencső L.: Detection of *Mycoplasma bovis* with an improved PCR assay. *Acta Veterinaria Hungarica* 2006, 54, 427-435.
26. Thomas A., Dizier I., Linden A., Mainil J., Frey J., Vilei E. M.: Conservation of the uvrC gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis. *Vet. J.* 2004, 168, 100-102.
27. Tonelli A., Sacchini F., Krasteva I., Zilli K., Scacchia M., Beaurepaire C., Nantel A., Pini A.: One test microbial diagnostic microarray for identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* and other *Mycoplasma* species. *Mol. Biotechnol.* 2012, 52, 285-299.

Adres autora: mgr inż. Ewelina Szacawa, Zakład Chorób Bydła i Owiec, Państwowy Instytut Weterynaryjny – PIB, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: ewelina.szacawa@piwet.pulawy.pl