ROSÂNGELA CLARET DE OLIVEIRA

**Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de
ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e
seqüenciamento do gene 16S rRNA**

**São Paulo
2008**

Rosângela Claret de Oliveira

**Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de
ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e
seqüenciamento do gene 16S rRNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Timenetsky

**São Paulo
2008**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2025
FMVZ

Oliveira, Rosângela Claret de

Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA / Rosângela Claret de Oliveira. – São Paulo : R. C. Oliveira, 2008.
138 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

1. Ureaplasma. 2. Ovino. 3. Caprino. 4. PFGE. 5. 16S rRNA. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Diagnóstico pelo cultivo e PCR dos principais micoplasmas associados à problemas reprodutivos em ovinos e caprinos e caracterização genotípica pela RFLP", protocolo nº514/2004, utilizando 360 caprinos e ovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Jorge Timenetsky - ICB, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Diagnosis of mycoplasmas associated with reproductive disturbs in ovines and caprines by culture and PCR and genotypic characterization by RFLP", protocol number 514/2004, utilizing 360 caprines and ovines, under the responsibility of Prof. Dr. Jorge Timenetsky - ICB, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 09 de setembro de 2004

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: OLIVEIRA, Rosângela Claret

Título: Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e sequenciamento do gene 16S rRNA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Maurício, pelo amor dedicado e presença imprescindível em todos os momentos da minha vida, amo você.

Aos meus pais Réia e Oliveira pelo amor, compreensão e fundamental felicidade em família, estimulando-me sempre a buscar meus sonhos.

A minha irmã Cássia que me ensinou a cultivar o amor,
semear esperança e colher alegria

A minha sobrinha Beatriz, a mais nova integrante
que integrou nossos corações.

Ao meu sobrinho Carlos pela capacidade de dedicação,
maneira sábia de viver e apoio incondicional

A Tia Olinda que pelos caminhos
da vida não pode mais nos
acompanhar, mas que sua presença
será sempre lembrada com muito
amor e carinho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Jorge Timenetsky pela orientação,
amizade e confiança depositada em mim.

Muito obrigada

A Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de São Paulo (FAPESP),
pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho
não seria realizado

AGRADECIMENTOS

A Deus nosso Pai, que pela sua bondade infinita a todos concede...

À Profa. Lillian Gregory e aos alunos Enoc, Marjore e Uber pelo auxílio indispensável na obtenção das amostras clínicas.

À Profa. Márcia P. A. Mayer e alunos do laboratório de microbiologia oral.

Ao Dr. Silvio Arruda Vasconcellos da FMVZ - USP.

Aos amigos Helo(maninha), Jota e família pelo apoio imprescindível e acolhida incondicional. Sem vocês eu não estaria aqui. Muito obrigada.

À minha nova família: Paulo, Cris, Ione, Tiyo, Taka, Harumi, Nana, Massaki, Clo, Yoshi, Elza, Toshio, pelo apoio e compreensão constante.

À Melissa, minha irmã por escolha....não tenho palavras, muito obrigada.

Ao Denys pela imensurável paciência e compreensão nos momentos que “seqüestrei” sua esposa, minha irmã.

Aos colegas de laboratório: Ana Magda, minha, Buim, Celminha, Elena, Juju, Luquinha, Mau, Pequena, Priscila, Rezinha obrigada pelos ótimos momentos de alegria, companheirismo e discussões calorosas. E muito bom ter amigos presentes e trabalhar em equipe.

À Ádina pelo incentivo, apoio e amizade.

À minha mais nova amiga Ericka, pelas valiosas trocas e experiências.

À prima Cecília e família pela colaboração e incentivo.

Aos Funcionários da sala de esterilização do ICB II.

Às bibliotecárias da FMVZ – USP, em especial a Elza pela atenção e simpatia na orientação sobre as diretrizes e formatação da Tese.

À Tânia, Cláudia e Dayse da pós-graduação da FMVZ - USP.

A todos, não mencionados, que viabilizaram de alguma forma o desenvolvimento deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Se eu pudesse deixar algum presente à você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída”

Mahatma Gandhi

RESUMO

OLIVEIRA, R. C. **Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e sequenciamento do gene 16S rRNA** [Isolation of ureaplasma and mycoplasma from reproductive tract of sheep and goats and genotypic typification by PFGE and 16S rRNA gene sequencing]. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Micoplasmas e ureaplasmas têm sido isolados de pequenos ruminantes, mas existem poucos estudos. O *Mycoplasma* ovine/caprino sorotipo 11, conhecido como cepa 2D, ainda não classificado como espécie, vem sendo relacionado a casos de vulvovaginite e problemas reprodutivos em ovinos e caprinos. Os ureaplasmas apresentam a habilidade em induzirem doenças no trato genital, confirmada por inoculações experimentais de isolados obtidos de animais doentes em animais saudáveis, resultando em moderada granularidade e hiperemia na vulva. Estes ureaplasmas não receberam ainda a designação de espécie, sendo apenas conhecidas suas características sorológicas, nas quais é fundamentada a classificação em nove sorotipos, sendo o IX relacionado a infertilidade e aborto em ovelhas. Este trabalho teve como objetivo o isolamento de micoplasmas e ureaplasmas do trato reprodutivo de fêmeas e machos das espécies caprina e ovina e tipificação genotípica dos isolados por meio de PFGE e sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram obtidos 20 isolamentos de ureaplasma no trato reprodutivo de fêmeas e machos da espécie ovina, um isolamento de micoplasma e sete com crescimento misto de micoplasma e ureaplasma. Nas fêmeas da espécie caprina foram obtidos cinco isolamentos, sendo quatro de ureaplasma e um de micoplasma. Dos isolados submetidos a PFGE, 11 de origem ovina resultaram em oito diferentes perfis confirmando a capacidade da técnica em tipificar ureaplasma de origem ovina. O sequenciamento do gene 16S rRNA, analisado pelo UPGMA, permitiu agrupar seis isolados ao *Ureaplasma diversum* ATCC 49782, e quatro não foram agrupados com nenhuma outra espécie de ureaplasma, quando utilizado o ponto de corte 97%. Em nosso estudo, os isolados de ovino e caprino agrupados às referências de *U. diversum* não permite concluir que sejam da mesma espécie. A utilização do gene

16S rRNA gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas e pode ser a primeira escolha na investigação de novas espécies. Técnicas filogenéticas como sequenciamento do espaço intergênico 16S-23S rRNA, e gene da urease podem auxiliaram futuramente na classificação dos isolados obtidos de ovino e caprino.

Palavras chaves: ureaplasma, ovino, caprino, PFGE, 16S rRNA

ABSTRACT

OLIVEIRA, R.C. **Isolation of ureaplasma and mycoplasma from reproductive tract of sheep and goats and genotypic typification by PFGE and 16S rRNA gene sequencing** [Isolamento de ureaplasma e micoplasma do trato reprodutivo de ovinos e caprinos e tipificação genotípica por meio da PFGE e seqüenciamento do gene 16S rRNA.]. 2008. 138f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Mycoplasmas and or ureaplasmas have been isolated from small ruminants but are few studied. *Mycoplasma* ovine/caprine serotype 11, known as 2D strain, has not been classified yet as specie. However, it has been associated to vulvovaginitis and reproductive disorder in caprine and ovine. Ureaplasmas may cause genital tract diseases. Experimental infections with isolates recovered from sick animals resulted in granularity and hyperemia of the vulva. These have not been designated as specie but are divide in nine serological characteristics types. The serotype IX is associated to infertility and abortion in sheep. The present study aims the isolation of mycoplasmas and ureaplasmas from reproductive tract of ovine and caprine, genotyping of isolates by PFGE, and sequencing of their 16S rRNA. Ureaplasma isolates were recovered from the reproductive tract of 20 ovine, being them, male and female. Mycoplasma was isolated alone in one sample. A mixture of mycoplasma and ureaplasma was obtained in seven samples. On the material obtained from female caprine, five isolations were performed. Four of them were ureaplasma and one was a mycoplasma. Eleven isolates from ovine showed eight distinct profiles at PFGE, confirm that the method can typify ovine origin ureaplasmas. Six isolates were grouped to the *Ureaplasma diversum* ATCC 49782, through the sequencing of their 16S rRNA using the UPGMA. However, when using a 97% cutoff, four isolates could not be grouped to none of the ureaplasma specie. The isolates from ovine and caprine grouped to *U. diversum*, do not allow conclude that they are all the same specie. The use of 16S rRNA sequencing showed many useful information to phylogenetic inference, and can be the first choice for when investigating new species. Phylogenetic techniques, as sequencing

of the intergenic space 16S-23S rRNA and urease gene, can be used to help the classification of new ureaplasma isolates from ovine and caprine.

Key words: ureaplasma, sheep, goat, PFGE, 16S rRNA

LISTA DE FIGURAS

Figura. 1	Árvore filogenética mostrando divergências dos <i>Mollicutes</i> em dois braços.....	32
Figura 2	Os dois procedimentos mais utilizados para caracterizar seqüências nucleotídicas com fins de identificação e/ou discriminação de microrganismos.....	51
Figura 3	Colônias de <i>Mycoplasma</i> spp. (com núcleo e sem núcleo) isoladas de material biológico da espécie ovina (100x;microscópio).	70
Figura 4	Colônias de <i>Ureaplasma</i> spp (A) e Mista (<i>Ureaplasma</i> spp e <i>Mycoplasma</i> spp:B) isoladas de material biológico da espécie ovina (A: 40x; B:100x; microscópio estereoscópico).....	71
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR (subunidade 16S rRNA) utilizando “primers” genéricos GPO3/MGSO, a partir do DNA extraído de amostras clínicas de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna 1 a 10: amostras de muco vulvovaginal sendo positivas as colunas 2, 4, 5, 7 e 9. Coluna 11: controle negativo das reações com água ultra-pura. Coluna 12: controle positivo da reação com DNA de <i>Mycoplasma bovis</i> . Coluna 13: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp.....	71
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR (subunidade 16S rRNA) espécie <i>Acholeplasma laidlawii</i> , utilizando “primers” UNI /ACHA3, a partir do DNA extraído de amostras clínicas de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna 1: controle positivo da reação com DNA de <i>A. laidlawii</i> . Colunas 2 a 6 amostras mucovulvovaginal sendo positivas as colunas 2 e 3. Coluna 7: controle negativo das reações com água ultra-pura. Coluna 8: padrão de peso molecular.....	72
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR (subunidade 16S rRNA) espécie <i>Mycoplasma arginini</i> , com “primers” MAGF/GP4R, a partir do DNA extraído de amostras clínicas de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna 01 a 08: amostras muco vulvovaginal negativas; Coluna 09: controle positivo da reação com DNA de <i>M. arginini</i> . Colunas 10: controle negativo das reações com água ultra-pura. Coluna 11: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp.....	73
Figura 8	PFGE (Programa I, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%) do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, referente à quantidade de BSA, utilizada na digestão enzimática com a enzima <i>SaII</i> . Coluna 1 a 4: amostras de referência digeridas com BSA 1,5µL (100mg/mL); Coluna 5 a 7: amostras de referência digeridas com BSA com 0,5µL (100mg/mL), Coluna 8 a 11: amostras de referência digeridas sem BSA. PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	74
Figura 9	PFGE (Programa I, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>SaII</i> e BSA (1,5mg/mL), referente à padronização da corrida eletroforética sem Thiourea. Coluna 1 a 3: amostras de referência. PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	75

Figura 10	PFGE (Programa I, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>Sall</i> e BSA (1,5mg/mL), referente à padronização da corrida eletroforética com Thiourea, no gel e tampão de corrida, a 150ng/mL. Coluna 1 a 3: amostras de referência. PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	76
Figura 11	PFGE (Programa IV, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%) do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>Sall</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Colunas 1 a 3: <i>U. urealyticum</i> (T960). Coluna 4 a 6: <i>U. diversum</i> (ATCC 49783); Coluna 1A e 4A: Tampão A; Coluna 2B e 5B: Tampão B e Coluna 3C e 6C: Tampão C. PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	77
Figura 12	PFGE (Programa II, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>Sall</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1 e 2: <i>U. diversum</i> (ATCC 49783); Colunas 3 e 4: <i>U. urealyticum</i> (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	79
Figura 13	PFGE (Programa III, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>Sall</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1 e 2: <i>U. urealyticum</i> (T960); Colunas 3 e 4: <i>U. diversum</i> (ATCC 49783). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	80
Figura 14	PFGE (Programa V, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>Sall</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: <i>U. urealyticum</i> (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	81
Figura 15	PFGE (Programa VI, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>Sall</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: <i>U. diversum</i> (ATCC 49783); Coluna 2: <i>U. urealyticum</i> (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	82
Figura 16	PFGE (Programa VII, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>Sall</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: <i>U. urealyticum</i> (T960); Coluna 2: <i>U. diversum</i> (ATCC 49783). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	83
Figura 17	PFGE (Programa VIII, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com <i>Sall</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1 a 3: <i>U. urealyticum</i> (T960); Coluna 4 a 6: <i>U. diversum</i> (ATCC 49783). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	84

Figura 18	PFGE (Programa IX gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepa de referência de ureaplasma e isolado clínico, digestão enzimática com <i>SaI</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: isolado clínico de sêmen de ovino; Coluna 2: <i>U. urealyticum</i> (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	85
Figura 19	PFGE (Programa X gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepa de referência de ureaplasma e isolado clínico, digestão enzimática com <i>SaI</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: isolado clínico de sêmen de ovino; Coluna 2: <i>U. urealyticum</i> (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	86
Figura 20	PFGE (Programa XI gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepa de referência de ureaplasma e isolado clínico, digestão enzimática com enzima <i>SaI</i> e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Colunas 1: <i>U. urealyticum</i> (T960). Coluna 2: <i>U. diversum</i> (ATCC 49783); Coluna 3: <i>U. diversum</i> (ATCC 49782); Coluna 4: isolado de sêmen de Touro; Coluna 5: isolado de sêmen de ovino (1004); Coluna 6: isolado de sêmen de ovino (3012); Coluna 7: isolado de mucovulvovaginal de ovino (s/n enoc). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).....	87
Figura 21	Dendograma obtido, pelo UPGMA por análise de agrupamento (coeficiente de DICE, otimização 1%), dos fragmentos de DNA de isolados clínicos de ureaplasma da espécie ovina com distúrbios reprodutivos, isolado de bovino e cepas de referência (ATCC 49782, ATCC 49783 e T960), digeridas pela enzima <i>SaI</i> . F: fêmea, M: macho, P: propriedade. Seta: ponto de corte "Cluster": 1,2,3,4,5,e 6 Dendograma obtido, pelo UPGMA por análise de agrupamento (coeficiente de DICE, otimização 1%), dos fragmentos de DNA de isolados clínicos de ureaplasma da espécie ovina com distúrbios reprodutivos, isolado de bovino e cepas de referência (ATCC 49782, ATCC 49783 e T960), digeridas pela enzima <i>SaI</i> . F: fêmea, M: macho, P: propriedade. Seta: ponto de corte "Cluster": 1, 2, 3, 4, 5,e 6.....	88
Figura 22	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando "primers" universais F16S/R16S, a partir do DNA extraído de culturas de isolados clínicos de muco vulvovaginal das espécies caprina e ovina e sêmen de ovinos. Coluna 01: peso molecular; Coluna 2: 4 cap F P9; Coluna 3: 49 ov F P2; Coluna 4: controle negativo; Coluna 5: 330 ov F P1; Coluna 6: 1004 ov M P1; Coluna 7: 3012 ovi M P1; Coluna 8: <i>Ureaplasma diversum</i> ATCC 49783.....	89
Figura 23	Eletroforese, em gel de agarose, da PCR, dos produtos amplificados utilizando "primers" universal F16S/R16S, a partir do DNA extraído de cultura de isolado clínico de muco vulvovaginal das espécies caprina. Coluna 01: peso molecular; Coluna 2 a 9: 4capFP9. Coluna 2: 58°C; Coluna 3: 58,5°C; Coluna 4: 59,7°C; Coluna 5: 60,5°C; Coluna 6: 61,3°C; Coluna 7: 63°C; Coluna 8: 64°C.....	89
Figura 24	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando "primers" universais F16S/R16S, a partir do DNA de culturas de cepas de referência e isolados de material clínico de muco vulvovaginal e sêmen da espécie caprina e ovina. Coluna 1 a 8 e 10: isolado clínico de fêmea ovina; Coluna 9: isolado clínico de fêmea caprina; Coluna 11 e 12: isolado clínico de sêmen ovino; Coluna 13 a 15: cepas de referência; Coluna16: controle negativo da reação com água ultra-pura Coluna 17: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp.....	91

Figura 25	Eletroforese em gel (agarose 2%) dos produtos da PCR utilizando “primers” F16S/R16S a partir do DNA purificado de culturas isoladas de muco vulvovaginal e sêmen das espécies caprina e ovina. Coluna 1: Mass ladder, Coluna 2 a 16: isolados clínicos e cepas de referência.....	91
Figura 26	Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos dos isolados clínicos ovino/caprino e cepas de referência obtidas pelo sequenciamento com o “primer” F16S. Em destaque: regiões homólogas para micoplasma e ureaplasma escolhida para o “primer” RCO3.....	92
Figura 27	Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos dos isolados clínicos ovino/caprino e cepas de referência obtidas pelo sequenciamento com o “primer” R16S. Em destaque: regiões homólogas para micoplasma e ureaplasma escolhida para o “primer” RCO4.....	93
Figura 28a	Representação esquemática utilizada no desenho dos “primers” RCO3/RCO4 para o sequenciamento da região interna ao gene 16S rRNA dos isolados clínicos e cepas de referência.....	94
Figura 28b	Localização dos “primers” F16S e R16S (preto) e RCO3 posição 335pb 5’→3’ e RCO4 posição 407pb 3’→5’ (cinza) na seqüência completa do gene 16S rRNA do <i>Ureaplasma urealyticum</i> (GenBank nº AY 121094).....	94
Figura 29	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando “primers” RCO3/RCO4, a partir do DNA de culturas de cepas de referência e isolados de material clínico de muco vulvovaginal e sêmen da espécie caprina e ovina. Coluna 1 a 4: isolados clínicos Coluna 5 a 7: cepas de referência. Coluna 8: controle negativo da reação com água ultra-pura Coluna 9: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp.....	95
Figura 30	Representação esquemática utilizada no desenho dos “primers” RCO5/RCO6 para o término do sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados clínicos e cepas de referência.....	96
Figura 31	Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos dos produtos obtidos pelos “primers” R16S, F16S, RCO3, RCO4, RCO5 e RCO6, do gene 16S rRNA de ureaplasma e micoplasma isolados de muco vulvovaginal e sêmen das espécies caprina/ovina com problemas reprodutivos e cepas de referência. ov: ovino; cap: caprino; F: fêmea; M: macho; P: propriedade.....	99
Figura 32	Alinhamento da seqüência primárias de nucleotídeos dos produtos obtidos pelos “primers” R16S, F16S, RCO3, RCO4, RCO5 e RCO6, do gene 16S rRNA de isolado de micoplasma obtido de muco vulvovaginal da espécie ovina com problemas reprodutivos, <i>Mycoplasma ovine/caprino</i> sorogrupo 11 (GenBank nº AY121094). e <i>Mycoplasma bovigenitalim</i> (GenBank nº AY121098) ov: ovino; F: fêmea; P: propriedade.....	100
Figura 33	Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos dos produtos obtidos pelos “primers” R16S, F16S, RCO3, RCO4, RCO5 e RCO6, do gene 16S rRNA de ureaplasma e micoplasma isolados de muco vulvovaginal e sêmen das espécies caprina/ovina com problemas reprodutivos, cepas de referência e cepas depositadas no GenBank. ov: ovino; cap: caprino; F: fêmea; M: macho; P: propriedade.....	105
Figura 34	Dendograma (UPGMA) das seqüências primárias de nucleotídeos de isolados de ureaplasma e micoplasma obtidos de material clínico das espécies caprina e ovina e cepas de referência. Seta: ponto de corte ≥ 97% considerado na similaridade intraespecífica. ov: ovino; cap: caprino; F: fêmea; M: macho; P: propriedade.....	106

Figura 35 Dendograma obtidos, pelo UPGMA, de seqüências primárias de nucleotídeos de isolados clínicos das espécies caprina/ovina, cepas de referência de ureaplasma (*U. diversum* ATCC 49782, 49783 e *U. urealyticum* T960) e espécies de ureaplasmas e *Mycoplasma* ovine/caprino sorogrupos 11 depositados no GenBank. Seta: ponto de corte $\geq 97\%$ considerado na similaridade intraespecífica. ov: ovino; cap: caprino; F: fêmea; M: macho; P: propriedade; sor: sorogrupo..... 108

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	“Primers” GPO3/MGSO utilizados na reação de PCR com as seqüências de nucleotídeos e o tamanho do produto amplificado.....	59
Quadro 2 -	“Primers” UNI/ACH3 utilizados na reação de PCR com as seqüências de nucleotídeos, tamanho do produto amplificado e localizações.....	60
Quadro 3 -	“Primers” MAGF/GP4 utilizados na reação de PCR com as seqüências de nucleotídeos, tamanho do produto amplificado e localizações.....	60
Quadro 4 -	“Primers” F16S/R16S utilizados na reação de PCR para seqüenciamento do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos e o tamanho do produto amplificado.....	66
Quadro 5 -	“Primers” RCO3/RCO4 utilizados na reação da PCR para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos, tamanho do produto amplificado e localizações.....	67
Quadro 6 -	“Primers” F16S/RCO5 e RCO6/R16S utilizados na reação da PCR para seqüenciamento da região interna do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos e tamanho dos produtos amplificados.....	68
Quadro 7-	Programas compostos de dois estágios, com pulsos e tempo de corrida, utilizados na PFGE.....	78

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Espécies de micoplasma e ureaplasma e o número de identificação no GenBank escolhidas para alinhamento do gene 16S rRNA na formação do dendograma.....	69
Tabela 2 -	Isolados clínicos de ureaplasma, das espécies caprina e ovina, e cepas de referência submetidos à PCR com “primers” R16S/F16S para a amplificação e sequenciamento completo do gene 16S rRNA.....	90

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS <i>MOLLICUTES</i>	28
2.2	EVOLUÇÃO, TAXONOMIA E GENÉTICA.....	31
2.3	NUTRIÇÃO.....	34
2.4	HOSPEDEIROS.....	36
2.4.1	Micoplasmose em caprinos e ovinos.....	38
2.5	ASPECTOS DE PATOGENICIDADE.....	39
2.6	DIAGNÓSTICO.....	42
3	Objetivos.....	55
3.1	GERAL.....	55
3.2	ESPECÍFICOS.....	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
4.1	CEPAS DE REFERÊNCIA.....	56
4.2	MEIOS DE CULTURA.....	56
4.3	AMOSTRAS CLÍNICAS.....	56
4.4	CULTIVO DE <i>Mycoplasma</i> spp. E <i>Ureaplasma</i> spp. DE AMOSTRAS CLÍNICAS.....	57
4.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	58
4.5.1	Extração de DNA das cepas de referências e do material clínico.....	58
4.5.2	PCR com “primers” para Classe <i>Mollicutes</i>.....	59
4.5.3	PCR com “primers” espécie-específico para <i>Acholeplasma laidlawii</i>.....	60
4.5.4	PCR com “primers” espécie-específico para <i>Mycoplasma arginini</i>.....	60
4.5.4	Deteccção do produto amplificado.....	61
4.6	ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE).....	61

4.6.1	Obtenção do sedimento microbiano.....	62
4.6.2	Extração do DNA de ureaplasma contido nos blocos de agarose.....	62
4.6.3	Digestão enzimática.....	63
4.6.4	Padronização dos programas de eletroforese para PFGE.....	63
4.6.5	PFGE das estirpes de <i>U. diversum</i> , <i>U. urealyticum</i> e isolados clínicos.....	65
4.6.6	Análise da PFGE.....	65
4.7	SEQUENCIAMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS.....	65
4.7.1	Otimização da PCR com “primers” F16S e R16 e sequenciamento do gene 16S rRNA.....	65
4.7.2	Sequenciamento.....	67
4.7.2.1	Padronização da PCR com “primers” RCO3 e RCO4.....	67
4.7.3	Sequenciamento com novos “primers” RCO5 e RCO6.....	68
4.7.4	Análise do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	69
5	RESULTADOS.....	70
5.1	ISOLAMENTO.....	70
5.2	PCR PARA DETECÇÃO DA CLASSE <i>Mollicutes</i>	71
5.3	PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Acholeplasma laidlawii</i>	72
5.4	PCR PARA DETECÇÃO DE <i>Mycoplasma arginini</i>	72
5.5	OTIMIZAÇÃO DA PFGE.....	73
5.5.1	Tempo de centrifugação e tampão de lavagem.....	73
5.5.2	Digestão enzimática.....	74
5.5.3	Concentração de Thiourea.....	75
5.5.4	Tampão de lavagem.....	76
5.5.5	Padronização dos programas de eletroforese.....	78
5.5.6	PFGE para isolados clínicos e cepas de referência.....	86
5.5.7	Análise da PFGE dos produtos obtidos pela digestão da enzima <i>SaI</i> com isolados clínicos e cepas de referência de ureaplasma.....	88
5.6	SEQUENCIAMENTO.....	89
5.6.1	PCR com “primers” F16S/R16S.....	90

5.6.2	Análise dos seqüenciamentos obtidos pelos “primers” F16S/R16S.....	92
5.6.3	Localização dos novos “primers” RCO3 e RCO4 no gene 16S rRNA.....	94
5.6.4	PCR com “primers” RCO3/RCO4.....	95
5.6.5	Confirmação do seqüenciamento na seqüência interna do gene 16S rRNA.....	95
5.6.6	Alinhamento das regiões amplificadas.....	96
5.6.7	Análise do sequenciamento completo do gene 16S rRNA dos isolados clínicos e cepas de referência de ureaplasma.....	106
6	DISCUSSÃO.....	109
7	CONCLUSÕES.....	119
	REFERÊNCIAS.....	120
	ANEXOS.....	135

1 INTRODUÇÃO

A otimização da criação de caprinos e ovinos encontra-se em franca expansão no país, a procura de novos mercados que estão sendo conquistados e sedimentados, necessitando de investimento tecnológicos, visando o aumento da produtividade (VIEIRA, 2005).

As atividades de caprinocultura e ovinocultura têm se consolidado como agronegócio brasileiro, em 2005 o rebanho de ovinos correspondia a 16,05 milhões de cabeças e o de caprinos a 10,31 milhões. A região Nordeste detém hoje 56,3% do rebanho de ovinos e 93,0% de caprinos. A região Sul representa 31,6% de ovinos e 2,0% de caprinos e a região Sudeste é responsável por 3,4% do rebanho de ovinos e 2,4% do rebanho de caprinos (ANUALPEC, 2005).

A ovinocaprinocultura constitui uma atividade bastante desenvolvida no Sul e no Nordeste semi-árido do Brasil (ASSIS et al., 2003). Na região Nordeste, a produção de pequenos ruminantes é particularmente expressiva, sendo explorada por importantes segmentos de unidades produtivas, abrangendo desde a agricultura familiar até empresas rurais organizadas em moldes empresariais (GOUVEIA, 2003; ANUALPEC, 2005; NOGUEIRA, 2005).

Países como a Austrália e Nova Zelândia exportam anualmente toneladas de carnes ovina e caprina enquanto o Brasil importa (FAO, 2004), que indicando a falta de otimização desta atividade no país, cuja extensão territorial é muito superior à daqueles países.

A ovinocaprinocultura no Estado de São Paulo vem se consolidando, seja pelo aumento no efetivo dos rebanhos ou pelo aumento do número de propriedades envolvidas nessa atividade e suas especializações. No Estado de São Paulo o rebanho de caprinos e ovinos em 1996 era de 64,9 mil e 257,4 mil cabeças, respectivamente. Em 2005, atingiu 82,1 mil cabeças de caprinos (aumento de 26,5%) e 324,7 mil cabeças de ovinos (aumento de 26,1%) (ANUALPEC, 2005). Isto também é evidenciado pela demanda por matrizes e reprodutores e pela expressiva expansão de procura por carne, leite e pele. Esses produtos poderão ainda expandir por diferentes subprodutos resultando em grande agregação de valor (MELLO et al., 2005).

A região sudeste do Brasil, caracterizada pela alta densidade populacional, constitui-se em um potencial mercado consumidor, com demanda alta por produtos alimentícios das mais diversas origens. Em contraste com os baixos índices produtivos ainda constatados no Brasil, verifica-se o crescimento acentuado na demanda pelos produtos de ovinocaprinocultura de corte. Entretanto, a demanda encontra-se reprimida em função da falta dos produtos e também por certa lentidão no crescimento do segmento produtor, que não vislumbra uma estrutura comercial mais consolidada. Parte considerável desse mercado ávido, porém latente, é suprido pela matéria-prima importada de países do Mercosul e de outros continentes. Existe um amplo mercado nacional a ser conquistado, que dependerá fundamentalmente da organização do setor (MELLO et al., 2005; VIEIRA, 2005).

A região Sudoeste paulista apresenta aspectos propícios para a efetiva consolidação da caprinocultura: boas condições climáticas, produção constante de alimentos para uso animal, tradição e aptidão na bovinocultura de leite e corte que permitem a criação consorciada de espécie, interesse dos produtores familiares, mercados consumidores próximos, articulação de instituições públicas e privadas presentes na região e linhas de crédito específicas para o setor (MELLO, 2003; ANUALPEC, 2005; NOGUEIRA, 2005). Aliando-se a isso, as características da espécie caprina (docilidade, porte pequeno e relativa rusticidade), permitem a sua exploração, utilizando mão-de-obra exclusivamente familiar – abundante na região – e instalações simples e de baixo custo (NOGUEIRA et al., 2005). Dessa maneira, a atividade apresenta-se como alternativa a ser considerada na política de viabilização sócio-econômica da propriedade rural familiar, seja propiciando um incremento na renda *per capita*, seja pela melhoria no nível nutricional da família do pequeno produtor, pela disponibilidade de proteína animal de alto valor biológico, além de promover a fixação do homem ao meio rural (MELLO, 2005).

Os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais têm demonstrado grande crescimento da ovinocaprinocultura. A Zona da Mata de Minas Gerais, assim como a região Serrana do Rio de Janeiro, apresentam grande potencial para a ovinocaprinocultura e constituem-se no principal pólo nacional de produção de leite de cabra. No entanto, diversos problemas verificados nos sistemas de produção, constituem fatores limitantes para a produtividade dos rebanhos, e, por extensão, para a qualidade e a regularidade na oferta dos produtos deles derivados (EMPARN, 2006). Dentre os entraves para maior expansão da atividade, questões ligadas ao

manejo sanitário têm externado expressivas perdas nos índices produtivos, resultando na incapacidade de uma expansão exponencial da ovinocaprinocultura (VIEIRA, 2005). De modo geral, faltam aos caprinocultores da região a percepção e o controle efetivo das várias fases que compõem a cadeia produtiva da atividade, que se inicia na produção, incluem o acesso do produtor à pesquisa e à informação tecnológica e vai até a distribuição, passando pela organização dos produtores, essencial para garantir a sua sustentabilidade no mercado (ANUALPEC, 2005; MELLO, 2005).

Assim, para enfrentar a competitividade nos agronegócios, a caprinocultura e a ovinocultura necessitam encontrar soluções no âmbito da gestão dos sistemas produtivos, com foco na qualidade dos produtos e na preservação do meio ambiente. Para obter êxito em qualquer exploração pecuária é necessário o conhecimento das condições normais dos animais, que são influenciadas pelo meio ambiente, práticas de manejo e pelo genótipo (SILVA et al., 2003; MELLO et al., 2005). O meio ambiente e o manejo inadequado são responsáveis pelo aparecimento de doenças no rebanho (GOUVEIA, 2003; EMPARN, 2006).

O estado sanitário dos animais, associado à ausência ou ao uso inadequado de tecnologias, constitui importante causa de baixa produção e rentabilidade dos rebanhos (VIEIRA et al., 1997).

As doenças afetam negativamente a produção, seja pelas perdas ocasionadas por distúrbios nas condições fisiológicas dos animais, determinando altas taxas de morbidade, ou devido à mortalidade e abortos. Estes fatores estão diretamente relacionados à redução no ganho de peso, queda na produção de leite e diminuição da qualidade e rendimento das carcaças (EMPARN, 2006).

Apesar dos avanços tecnológicos no desenvolvimento de drogas quimioterápicas e vacinas efetivas, as doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus, fungos, protozoários e parasitas permanecem como maior obstáculo no aumento da eficiência reprodutiva, principalmente nas criações intensivas.

A compreensão dos problemas reprodutivos oscila em diversas esferas: nutricional, genética, falhas no manejo, número de reprodutores, cruzamento, idade das fêmeas, problemas hormonais, tipo de criação, manejo sanitário e as doenças infecciosas, sendo considerado multifatorial (EMPARN, 2006).

Estima-se que a perda por doenças infecciosas esteja entre 15 a 20%. Estas doenças podem acometer muitos animais em curto período de tempo havendo

a necessidade no desenvolvimento de técnicas para diagnóstico rápidas e precisas associadas à implementação de medidas eficientes de controle. Entre as afecções que acometem os animais podemos destacar as genitais, que possuem causas diversificadas, resultando em grandes prejuízos a caprinovinocultura. Baixos índices reprodutivos resultam em baixos índices produtivos. A eficiência reprodutiva pode ser caracterizada por altas taxas de natalidade e baixas taxas de mortalidade. A taxa de natalidade do rebanho é influenciada pela taxa de concepção e pelo índice de mortalidade embrionária e abortamento. A ocorrência múltipla de distúrbios reprodutivos em fêmeas é denominada infertilidade e se caracteriza por um estro fraco ou ausente, volta repetida ou estro em intervalos regulares ou variáveis e uma tendência à parição prematura, natimortos ou abortamentos (BUZINHANI, 2006).

Os micoplasmas e ureaplasmas pertencentes à classe *Mollicutes* incluem-se entre os agentes causadores de infecções no trato reprodutivo dos animais (SHEPARD et al., 1974; RUHNKE et al., 1978; CARDOSO et al., 2001; BUZINHANI, 2006). A literatura referente à micoplasmose e à ureaplasmosse em ovinos e caprinos é escassa. Pouco se conhece sobre a patogenicidade desses microrganismos no envolvimento de patologias no sistema reprodutivo de pequenos ruminantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS *MOLLICUTES*

Os mollicutes estão amplamente distribuídos no Reino Animal como comensais, saprófitos ou patógenos (RAZIN; BARILE, 1985). Estes agentes estão associados a diversas doenças cujos sinais clínicos podem variar de agudo ou mais freqüentemente, crônicos (JASPER, 1967; TULLY, 1993; SAHU; YEDLOUTSCHNIG, 1994). Nas diferentes espécies de origem animais, os mollicutes são potenciais causadores de patologias no sistema respiratório, nervoso, urogenital glândula mamária, articulações e conjuntiva ocular (NASCIMENTO et al., 1986; AREERAMULU; KIRKBRIDE, 1987; STIPKOVITS et al., 1993; GARCIA et al., 1996).

O nome “micoplasma” foi usado para denotar os microrganismos da classe *Mollicutes*, mas sugeriu-se o uso do termo mollicutes como nome trivial, para designar qualquer microrganismo desta classe, e o termo micoplasma utilizado quando referido aos membros do gênero *Mycoplasma* (RAZIN, 1992). O termo micoplasma foi derivado das palavras gregas, *mykes* (fungo/filamentos) e *plasma* (forma). Esses procariotos pertencem à Divisão Tenericutes e à Classe dos *Mollicutes* - *molli* (suave); *cutes* (cútis ou derme) - nomenclatura associada à ausência de parede celular e do peptidoglicano, sendo seu citoplasma envolto somente pela membrana trilaminar que apresenta como constituinte o colesterol, composto presente somente em células animais.

A taxonomia destas bactérias é periodicamente ajustada, sendo a classe *Mollicutes* atualmente composta por cinco ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incertae sedis.*), seis famílias (*Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* e *Erysipelothrichaceae*) e 14 gêneros (*Mycoplasma*, *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelothrix*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium*). Devido ao estudo comparativo de genomas microbianos, os gêneros *Eperythrozoon*, *Haemobartonella*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium* foram incluídos aos mollicutes. Originalmente

muitas destas bactérias pertenciam às antigas riquetsias, sendo que algumas não cultiváveis foram agrupadas como hemoparasitas que causam principalmente anemias em alguns animais (JOHASSON; PETTERSSON, 2002). Nos gêneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Eperythrozoon* e *Haemobartonella* encontram-se os molícutes de maior interesse na área veterinária.

Em 1898, foi descrito por Nocard e Roux o primeiro isolamento de micoplasma, *Mycoplasma mycoides* subs. *mycoides*, agente causador da pleuropneumonia contagiosa bovina (CBPP). Desde o primeiro achado, estes microrganismos têm sido isolados em diferentes espécies animais, podendo resultar em perdas econômicas na agropecuária e na pesquisa biomédica (RAZIN, 1995).

A natureza dos molícutes tem representado um desafio na compreensão de sua biologia, classificação e taxonomia. Por muito tempo, os micoplasmas foram considerados vírus, devido à capacidade de transpor filtros que bloqueavam a passagem de bactérias (RAZIN, 1992).

Os molícutes se diferenciam de outras bactérias principalmente pelo seu pequeno tamanho, ausência de parede celular (RAZIN, 1995) e por apresentarem requerimentos nutricionais diferenciados, quando comparados à maioria das bactérias de interesse veterinário e humano. Apesar da ausência de parede celular, sua forma geralmente é ovóide. Os micoplasmas, em geral, aproximam-se das dimensões dos maiores vírus (0,2 a 0,4µm). Poucas espécies, entretanto, apresentam-se espiraladas, atingindo cerca de 100µm. A forma filamentosa é "multinucleada" e pode ocorrer em determinados momentos da multiplicação, pela falta de sincronia entre a septação durante a divisão celular e a replicação do DNA. Assim, além da fissão binária, a partir dos filamentos, formam-se cadeias ou conjuntos de pequenos micoplasmas viáveis que se desprendem, e, sob pressão em filtros, podem transpor a porosidade de 0,22µm (BASEMAN; TULLY, 1997).

O crescimento destes microrganismos, em meio sólido, é expresso em pequenas colônias de 50 – 500µm de diâmetro, usualmente em forma de "ovo frito", visualizadas com o auxílio de microscópio estereoscópico. O crescimento, em meio líquido, geralmente não causa turvação, resultando somente alteração no pH, revelado por um indicador presente no meio de cultura (RAZIN, 1995).

Apesar de não possuírem flagelos, algumas espécies exibem deslizamento sobre plástico ou vidro ou apresentam contração celular como *Mycoplasma*

amphoriforme, *M. gallisepticum*, *M. pulmonis*, *M. penetrans*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. alvi*, *M. svalvi* e *M. mobile*.

Alguns micoplasmas possuem estrutura ou prolongamento polar em sua superfície, onde há alta concentração de moléculas de adesão, que permite que esse microrganismo ligue-se à célula hospedeira (RAZIN, 2002). Acredita-se que estas estruturas, em algumas espécies, estejam envolvidas na penetração em células hospedeiras, processo descoberto no micoplasma de origem humana, o *M. penetrans* (LO et al., 1992).

O genoma dos *Mollicutes* é o menor conhecido entre procariotos. Membros desta classe têm sido divididos em dois grupos de acordo com o tamanho do genoma; um composto pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, que possui cerca de 770 a 800 Kpb, e o outro formado pelos gêneros *Acholeaplasma*, *Spiroplasma* e *Anaeroplasma*, que possuem o dobro do genoma (HEREMANN, 1992).

Os genomas são caracterizados por possuírem baixo conteúdo de guanina e citosina (C + G), variando de 24 a 33mol%, com exceção de algumas espécies, que possuem cerca de 41mol%. A determinação do conteúdo de DNA tem sido incluída entre os testes requeridos para a definição de novas espécies de *Mollicutes* (RAZIN, 1992).

Basicamente, os *Mollicutes* são divididos em dois grupos: fermentadores e não-fermentadores. Os fermentadores produzem ácidos por meio da metabolização da glicose e de outros carboidratos, diminuindo o pH do meio de cultivo, e os não-fermentadores que possuem a via da arginina-deidrolase como forma de ATP aumentando o pH (RAZIN, 1978).

Alguns micoplasmas são capazes de utilizar, ambas as vias, os ácidos produzidos na glicólise podem mascarar a alcalinização do meio de cultura causada pela hidrólise da arginina (OLSON et al., 1993). Outros micoplasmas não metabolizam açúcares e arginina, mas são capazes de oxidar ácidos orgânicos (lactato e piruvato) a acetato e CO₂ (MILES et al., 1994). Os ureaplasmas requerem uréia para produzir ATP, hidrolizando este composto e produzindo amônia (BASEMAN; TULLY, 1997; RAZIN, 2004;).

Muitas espécies de micoplasmas expressam de forma variável, na superfície celular, antígenos estruturalmente heterogêneos. Modificações nos genes, que codificam moléculas de adesão, revelam distintos modos de mutação capazes de gerar mudanças no tamanho e nas diversidades antigênicas das moléculas de

superfície, indicando um importante mecanismo na patogenicidade das infecções por micoplasmas, por mimetizar e escapar da resposta imune. Estas variações podem alterar os mecanismos de colonização e penetração dos micoplasmas nos tecidos (NICOLSON et al., 1999).

2.2 EVOLUÇÃO, TAXONOMIA E GENÉTICA

Os mollicutes pertencem a um braço da árvore filogenética da bactéria Gram-positiva com baixo conteúdo C+G (MANILOFF, 1992). O ancestral dos mollicutes originou-se do braço filogenético do *Streptococcus* há cerca de 600 milhões de anos atrás, provavelmente de um microrganismo com genoma aproximado de 2000 Kpb.

A árvore filogenética posteriormente originou dois braços maiores relacionados aos microrganismos há cerca de 450 milhões de anos, possivelmente a partir de um microrganismo com genoma de 1700 a 2000 Kpb (MANILOFF, 2002). Um dos braços originou os gêneros *Anaeroplasma*, *Asteroplasma* e *Acholeplasma* e o outro *Spiroplasma*, *Entomoplasma* e *Mycoplasma*. O *Phytoplasma* provavelmente originou-se do *Acholeplasma* e o *Ureaplasma* do *Mycoplasma* (Figura 1).

A taxonomia bacteriana iniciou de modo intuitivo e hoje, devido à grande aplicação dos métodos moleculares, deixou de ser empírica e passou a ser científica. Estudos, utilizando modificações na eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), têm resultado em fontes de dados adicionais sobre o tamanho genômico, importante na taxonomia. A relação de citosina e guanina (C+G) no DNA de procariotos é um efetivo parâmetro taxonômico e está incluído entre os testes para a definição de novas espécies de *Mollicutes*. Sequências de nucleotídeos proporcionam valiosas informações na determinação das relações genéticas entre diferentes bactérias e servem como base no estabelecimento de espécies (RAZIN, 1992).

Figura. 1 Árvore filogenética mostrando divergências dos *Mollicutes* em dois braços.
Fonte: Maniloff (2002).

Embora os mollicutes possuam pequeno genoma, que facilitam seu seqüenciamento, no momento há parciais informações obtidas pelos testes de hibridização de DNA-DNA e DNA-RNA, perfil por clivagem genômica e mapas genéticos. Seqüências dos genes 16S rRNA, de aproximadamente 40 espécies de mollicutes, estão disponibilizadas no GenBank e contribuem na solução de problemas taxonômicos. A compreensão da variabilidade genotípica inter-espécies e intra-espécie é importante no estudo da patogenicidade que tem grande relevância na taxonomia (RAZIN, 2002).

As informações genéticas dos mollicutes estão contidas na molécula circular de DNA, que possui as menores informações genômicas bacterianas conhecidas. Utilizando-se do tamanho desta molécula, os mollicutes podem ser divididos em dois grupos: um composto pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* com genoma aproximadamente de 600 a 1350 Kb e o outro, pelos gêneros *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, *Mesoplasma* e *Entomoplasma*, com 790 a 2200 Kb (HERRMANN, 1992).

Genomas de 500 MDa são limitados à algumas espécies dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* e até o momento, representam a menor carga genética de um microrganismo e portanto são considerados os representantes do menor sistema de vida. Sua capacidade limita-se à síntese de aproximadamente 700 proteínas essenciais codificadas por aproximadamente 500 genes sendo maioria voltada ao metabolismo no nível de membrana. Apesar do pequeno genoma, os micoplasmas facilitam a reorganização do DNA pela repetição de seqüências gênicas, promovem a alteração genética e patogênica proporcionando ampla variação antigênica. As poucas seqüências de reparo do DNA justificam esta diversidade.

A simplicidade genômica está correlacionada aos dados filogenéticos que indicam um processo de evolução degenerativa das eubactérias gram-positivas, envolvendo reduções de informações genéticas que estavam presentes em suas antecessoras. Os molícutes perderam a parede celular, algumas vias metabólicas e provavelmente parte da maquinaria genética molecular, simplificando especialmente a replicação do DNA e sistemas de reparos (LABARÈRE, 1992).

A divisão celular, replicação do DNA e sistemas de reparos são menos complexos, quando comparados a outras bactérias com genomas maiores. Nos micoplasmas, como em muitas espécies, a divisão celular e replicação não são coordenadas (RODWELL et al., 1972). Na maioria das bactérias o gene rRNA possui cinco a dez cópias, enquanto que nos micoplasma existe apenas uma a duas cópias, o que pode facilitar nos estudos sobre o controle de mecanismos de síntese do rRNA. Existem várias razões para focalizar atenção nestes genes, como a obtenção de produtos altamente conservados, que servem como marcadores filogenéticos e facilitam a seleção e clonagem de sondas para detecção e identificação dos molícutes (RAZIN, 1985).

Os molícutes parecem apresentar uma única DNA polimerase, em contraste às três DNA polimerases encontradas na *E. coli* e outros procariotos. Ainda não está claro, mas houve uma perda da atividade de exonuclease da DNA polimerase que pode proporcionar um marcador bioquímico indicativo de divergências entre os molícutes e eubactérias (MANILOFF, 1983).

2.3 NUTRIÇÃO

Os mollicutes estão no grupo de microrganismos nutricionalmente diferenciados, por requererem compostos não usuais quando comparados à maioria das bactérias. A sua íntima associação com células animais e plantas, como comensais ou patógeno, é resultado de sua dependência do hospedeiro para obtenção de nutrientes orgânicos e por condições ambientais relativamente constantes (RAZIN et al., 1998). O estudo nutricional não é realizado apenas para descrever fatores que influenciam o crescimento e isolamento dos mollicutes, mas também para demonstrar como as condições de nutrição e cultivo podem afetar a bioquímica, fisiologia e morfologia destes microrganismos e influenciar a adaptação genética de estirpes (MILES, 1992).

A definição de requerimentos orgânicos (aminoácidos, precursores de ácidos nucléicos, lipídeos, carboidratos, vitaminas e outros) para o crescimento está relacionada a diferentes vias metabólicas em cada gênero. Poucos estudos são realizados para compreensão dos requerimentos inorgânicos pelos mollicutes. Os elementos presentes nas células bacterianas e que podem ser acrescentados aos meios são: P (4,2%), Mg^{2+} (0,6%), K (1,2%) e Fe^{2+} (0,02%). Outros elementos, principalmente metais, podem ser necessários em pequenas quantidades (MILES, 1992).

A temperatura de aproximadamente 37°C é indicativa do “habitat” natural dos mollicutes que corresponde à dos mamíferos e pássaros. *Spiroplasmas*, que infectam plantas, têm temperatura ótima de crescimento de 30 a 32°C e os *Anaeroplasmas*, podem crescer a temperaturas de até 49°C (GARDELLA; DEL GIUDICE, 1983).

O crescimento e sobrevivência dos mollicutes são dependentes do pH. Para espécies originárias de plantas e vertebrados, o pH ótimo é de 7,4 e o crescimento ocorre entre pH 6,5 a 8,0. Os ureplasmas são exceções, o pH ótimo varia de 5,5 a 6,0 e seu crescimento é inibido em pH acima de 7,5 (RAZIN et al., 1978). A inibição do crescimento destas bactérias, em meios de cultura, pode ocorrer pela excessiva produção de ácidos ou álcalis gerados pelo metabolismo do próprio microrganismo.

A pressão osmótica durante o crescimento de algumas espécies de *Mycoplasma* spp. e *Acholeplasma laidlawii*, em meio líquido ou sólido, encontra-se próximo a 10 atm com variações entre os diferentes gêneros e espécies, podendo

atingir faixas de 6,5 a 32 atm. A variabilidade dos requerimentos osmóticos no crescimento de algumas espécies é significativa para a pesquisa, incluindo o isolamento e estudos nutricionais (RAZIN et al., 1978). Os requerimentos atmosféricos de um cultivo não devem ser analisados independentemente dos fatores de interações como o pH, composição do meio, oxidação e redução dos componentes do meio de cultivo e umidade.

Devido à perda de vias enzimáticas – características presentes em outras bactérias - e presença de vias ineficientes de produção de energia, algumas espécies utilizam a via glicolítica e produzem ácidos a partir de carboidratos. Outros mollicutes utilizam a via de hidrólise da arginina, que resulta na produção de ornitina, ATP, CO₂ e amônia, ou ainda o catabolismo da uréia (RAZIN, 1995; RAZIN, 2004).

O crescimento em meio sólido é expresso por pequenas colônias de 50-500µm de diâmetro, usualmente na forma de “ovo frito”, visualizadas pelo auxílio de microscópio estereoscópico. No exame microscópico, os limites da óptica dificultam o estudo dos mollicutes, devido ao seu pequeno tamanho. Em geral, no exame ao microscópio, os mollicutes possuem aproximadamente 0,3µm de diâmetro e 98µm de extensão. Frequentemente, os mollicutes apresentam pleomorfismo, podendo ser cocoidal a filamentoso (CARSON et al., 1992). Em muitas espécies, há evidências de formação de filamentos, especialmente durante a o início da fase exponencial. Rodwell et al. (1972) concluíram que crescimentos filamentosos ocorrem em quase todos mollicutes sob condições adequadas, e o aumento no tempo da cultura pode favorecer a mudança na forma. A morfologia também pode ser afetada pela qualidade nutricional, variação osmótica e pelo conteúdo de lipídio da membrana (MILES, 1992).

A complexidade dos requerimentos nutricionais, a variação na forma celular e a fragilidade osmótica fazem com que os mollicutes estejam sob constantes investigações quanto a sua fisiologia, para relatar seu crescimento e ecologia. As condições sob as quais eles crescem podem influenciar na estrutura e funcionamento das células hospedeiras, sendo importante, não somente para os fisiologistas, como também para todos micoplasmologistas envolvidos em estudos quantitativos (RAZIN et al., 1978).

2.4 HOSPEDEIROS

Os *Mollicutes* estão amplamente distribuídos na natureza como parasitas de humanos, animais, insetos e plantas. A detecção de novos hospedeiros para estas bactérias tem aumentado periodicamente a lista de espécies de micoplasmas. O habitat primário destes microrganismos em humanos e animais são as superfícies mucosas dos tratos respiratório, genital, orofaríngeo e oftálmico, bem como a glândula mamária e articulação (RAZIN, 1992; RAZIN, 1995).

Além dos mamíferos, incluindo alguns marinhos, esses microrganismos são também encontrados em peixes, aves e répteis, como patógenos, oportunistas ou comensais. Os insetos podem se contaminar com estes patógenos ou se tornarem vetores na transmissão de doenças para certas plantas. De forma singular, foram relatadas espécies de micoplasmas no solo e na água. Os micoplasmas usualmente possuem especificidade em relação ao hospedeiro e ao sítio de colonização, no entanto foram encontradas espécies de origem animal em humanos e vice-versa. O oportunismo dos *Mollicutes* gera controvérsias na biologia da relação parasito-hospedeiro desafiando a compreensão destas bactérias.

Aproximadamente, 200 espécies de *Mollicutes* são conhecidas, mas apenas um número reduzido, principalmente do gênero *Mycoplasma*, é considerado como patógeno de animais. As espécies patogênicas nos animais de produção causam grandes perdas econômicas. Algumas espécies, apesar de classificadas como comensais de mucosas, são consideradas importantes na medicina veterinária (FREY, 2002).

A maioria das espécies de micoplasmas conhecida é de origem animal e, portanto, existe grande diversidade na relação parasito-hospedeiro neste campo da micoplasmologia (SIMECKA et al., 1992). Estas bactérias também infectam animais silvestres, de experimentação e domésticos (RAZIN, 1995).

Em animais de laboratório (ratos e camundongos), o *M. pulmonis* é o mais freqüente agente etiológico da micoplasmose respiratória murina (MRM). A morbidade e a mortalidade podem ocorrer de forma significativa. No entanto, o maior impacto da infecção pelo *M. pulmonis* é a interferência nas interpretações dos resultados, quando estes animais são utilizados na pesquisa biomédica e não apresentam doença clínica. *M. arthritidis*, *M. muris*, *M. collis* e *M. neurolyticum* são

também espécies indesejáveis. A interferência de outros micoplasmas em pesquisas que utilizam animais de experimentação, além de ratos e camundongos, não é conhecida (BONIN, 2005).

Na avicultura, o *M. gallisepticum* é a espécie de maior importância econômica, em função das perdas decorrentes da Doença Crônica Respiratória (DCR). Severa aerossaculite e sinusite são as principais afecções encontradas em galinhas poedeiras, frangos de corte, perus, codornas e outras aves, que resulta em baixa conversão alimentar, diminuição na produção de ovos e acentuada condenação de carcaça. Outras espécies patogênicas são o *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. meleagridis* (METTIFOGO, 2003; BUIM, 2005).

Nos suínos, o *M. hyopneumoniae* é agente da pneumonia enzoótica que ocorre em todas as regiões do mundo em que a suinocultura é explorada. A doença caracteriza-se pela alta morbidade e baixa mortalidade, tosse crônica não produtiva, diminuição no crescimento e baixa conversão alimentar. O *M. hyorhinis* e o *M. hyosynoviae* são habitantes comumente encontrados no trato respiratório superior dos suínos e ocasionalmente provocam poliartrite e poliserosite (YAMAGUTI, 2003).

Nos bovinos, a Pleuropneumonia Contagiosa Bovina (PPCB), causada pelo *M. mycoides subsp. mycoides* é considerada a principal doença infecto-contagiosa do trato respiratório, caracterizada por intensa pleurite sero-fibrinosa e edema nos lóbulos e tecidos alveolares. A doença está entre as de notificação obrigatória e, segundo a OIE (Organização Internacional de Epizootias), até 1997, encontrava-se disseminado em países como a África e Ásia. Além da PPCB, os distúrbios respiratórios em bovinos são também causados pelo *M. bovis* e o *M. dispar*. O *M. bovis* é considerado a segunda espécie de maior patogenicidade entre os micoplasmas que afetam os bovinos (MARQUES, 2005). O microrganismo é responsável também por distúrbios reprodutivos, artrite, meningite e a mais grave e freqüente forma de mastite por micoplasmas em vários países do mundo. Outras espécies de micoplasmas relacionadas à mastite, tais como o *M. bovigentialium*, *M. canadense*, *M. bovirhinis*, *M. californicum*, *M. arginini* e *M. alkalescens*. O *M. bovigentialium*, *M. canadense* e o *U. diversum* estão associados aos distúrbios reprodutivos.

2.4.1 Micoplasmose em caprinos e ovinos

Nos pequenos ruminantes, especificamente em caprinos, a cepa F-38, atualmente designada *M. capricolum subsp. capripneumoniae subsp. nov.*, é considerada o agente responsável pela Pleuropneumonia Contagiosa Caprina (PPCC). Além desta espécie, o *M. mycoides subsp. mycoides*, *M. mycoides subsp. capri*, *M. agalactiae* e o *M. capricolum* causam pneumonia e septicemia com conseqüentes manifestações em outros órgãos causando mastite, poliartrite ou ceratoconjuntivite. Em ovinos, *M. agalactiae* é uma espécie de considerável importância na agalactia contagiosa e na pneumonia; *M. ovipneumoniae*, em sinergismo com a *Pastereulla haemolytica* e outros agentes, causa a pneumonia exsudativa proliferativa. Normalmente os micoplasmas são espécie-específico, ou seja, determinadas espécies provocam uma doença em hospedeiros definidos. No entanto, encontramos algumas espécies que são ubíquas, como *M. arginini*, ou mesmo saprófitas, a exemplo do *Acholeplasma laidlawii*. Nos ovinos e caprinos, diversos estudos relataram à presença de um complexo de micoplasmas comuns a estas espécies de animais sendo associadas aos distúrbios reprodutivos (KOTANI et al., 1980; JONES et al., 1983; NICHOLAS et al., 1999).

Mycoplasma ovine/caprino sorotipo 11, ainda não classificado como espécie e conhecido como cepa 2D, foi relacionado a casos de vulvovaginite e problemas reprodutivos de ovinos e caprinos na Austrália, Estados Unidos, Índia, Inglaterra, França e Nigéria (NICHOLAS et al., 1999). Além deste sorotipo, outras espécies são isoladas do trato reprodutivo com evidências circunstanciais de patogenicidade: *M. mycoides subsp. mycoides*, *M. bovis genitalium*, *M. agalactiae*, *M. mycoides subsp. capri*, *M. capricolum*, *M. arginini*, *M. alkalencens* e *Acholeplasma spp.* (JONES et al., 1983; KAPOOR et al., 1984; AK et al., 1995).

No gênero *Ureaplasma* atualmente são reconhecidas sete espécies de origem humana e as outras de origem bovina, canina, felina e aviária. Os ureaplasmas isolados de ovinos foram estudados por LIVINGSTON et al. (1978,1982) e BALL et al. (1985) por meio de inoculações experimentais, sendo o sorotipo IX relacionado como responsável por infertilidade e aborto em ovelhas. Estes ureaplasmas não receberam ainda a designação de espécie, sendo apenas conhecidas suas características sorológicas, nas quais é fundamentada a classificação em nove

sorotipos (HOWARD et al., 1978; KOTANI et al., 1980; HOWARD; POCOCK, 1983).

Informações obtidas em estudos anteriores não estabelecem claramente a casuística, epidemiologia, características clínicas, imunopatologia e controle da vulvovaginite e balanite em ovinos e caprinos. Deve-se destacar a confusão que pode ocorrer devido as diferentes nomenclaturas utilizadas por pesquisas realizadas em diferentes países nas descrições das lesões (RIZZO, 2006). Dentre os nomes sinônimos desta síndrome estão: vulvovaginite ulcerativa (IHEMELANDU, 1972), vulvovaginite (COTTEW et al, 1974), balanite e vulvovaginite (WEBB; CHICK, 1976), vulvovaginite granular (DOIG; RUHNKE, 1977), vulvites (BALL; MCCAUGHEY, 1982), balanite ulcerativa e vulvite (DUNN, 1996), balanopostite ulcerativa e vulvovaginite (TRICHARD et al., 1993; KIDANEMARIAM, 2003).

Os sinais clínicos associados aos exames microbiológicos auxiliam no diagnóstico da vulvovaginite e balanopostite. Sinais clínicos como balanopostite ulcerativa e vulvovaginite podem variar, dependendo da invasão bacteriana secundária, severidade e tempo da lesão. Isto proporciona incongruência na descrição dos sinais clínicos por diferentes autores (DENT, 1971; WEBB; CHICK 1976; TRICHARD et al., 1993, KIDANEMARIAM, 2003).

Dentre as espécies com potencial patogênico nas infecções genitais em pequenos ruminantes estão inclusos *Mycoplasma capricolum* (JONES et al., 1983), *Mycoplasma arginini* (JONES, 1979), *Mycoplasma mycoides mycoides*, *Mycoplasma ovine/caprino* sorotipo 11 (COTTEW et al., 1974; TRICHARD et al., 1993; KIDANEMARIAM, 2003), *Mycoplasma agalactiae* (JONES et al., 1983), *Acholeplasma laidlawii*, *Acholeplasma axantum* (JONES et al., 1983; KAPOOR et al., 1984) e *Ureaplasma* (BALL; MCCAUGHEY, 1982; LIVINGDTONE; GAUER, 1982). Embora espécies de *Acholeplasma* tenham sido isoladas de animais com vulvovaginite (KAPOOR et al., 1984) seu papel na etiologia ainda é incerto.

2.5 ASPECTOS DE PATOGENICIDADE

Nos animais e no homem, os micoplasmas podem ser encontrados aderidos intimamente às células do trato respiratório, urogenital e articulações. Esta aderência pode ser íntima a ponto de promover trocas antigênicas ou mesmo a fusão celular,

mas raramente invadem os tecidos e a corrente circulatória. A adesão pode ocorrer pela presença de proteínas interativas como as adesinas ou mesmo na sua ausência (RAZIN et al., 2002).

Em algumas espécies verificou-se que a adesão é realizada provavelmente por sialoglicoconjugados e glicolipídios sulfatados da célula hospedeira. A presença temporária ou prolongada de micoplasmas na superfície da célula pode interferir de diferentes modos na sua integridade. A eliminação de compostos do metabolismo primário como H_2O_2 ou NH_3 são suficientes para alterar a fisiologia celular. A presença de superantígenos, lipoproteínas e a diversidade antigênica dos micoplasmas induzem a modulação da resposta imune (ROTTEM, 2003). Desta maneira, justifica-se, em parte, a permanência e/ou a reincidência de micoplasmoses e a disseminação de outros agentes infecciosos nos hospedeiros. As adesinas têm sido caracterizadas em algumas espécies de micoplasmas, a exemplo da proteína P1 (168 kDa) do *M. pneumoniae* e a de 140 kDa do *M. genitalium*. Outras espécies de micoplasmas, igualmente, exibem proteínas de superfície responsáveis pela adesão: *M. hominis*, *M. bovis*, *M. gallisepticum* e *M. pulmonis*, enquanto espécies de micoplasmas que não possuem tais estruturas como *M. hyorhinitis*, *M. bovis genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*, são também capazes de realizar a cito-aderência, provavelmente por outras proteínas ou mecanismos alternativos de parasitismo. A falta da parede celular facilita a fusão da membrana do micoplasma com a célula hospedeira. Embora esta condição seja discutível, é considerada indicativa da interação de estruturas entre a membrana do hospedeiro e do micoplasma. Essa associação íntima proporciona um microambiente no qual ocorre a concentração de produtos tóxicos do metabolismo e conseqüentemente danos. O peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos produzidos pelo *M. pneumoniae* induzem a inibição irreversível da catalase endógena e que pode causar a diminuição do superóxido dismutase. A persistência deste conjunto aumenta as concentrações de H_2O_2 e O_2 causando danos oxidativos à célula hospedeira (ROTTEM, 2003; BLANCHARD; BROWING, 2005).

A limitação na síntese dos componentes para o metabolismo e a dependência do meio externo, somada à capacidade de interação com a célula hospedeira, sugerem que os micoplasmas necessitam dos componentes do hospedeiro e transformam este mecanismo em fator de patogenicidade. Os ureaplasmas possuem fosfolipases na membrana, e possivelmente ações diretas destas enzimas nos

substratos do hospedeiro produzem ácido aracdônico, diacilglicerol e lisofosfolipídios (RAZIN, 2002). Estas substâncias alteram a biossíntese de prostaglandinas e das funções normais da célula hospedeira. A necessidade de obtenção externa de ácidos nucléicos e proteínas para o seu metabolismo induzem a síntese de nucleases e proteases. As nucleases de *M. penetrans* reduzem a atividade da transcriptase reversa do vírus HIV, bem como possuem amplo espectro de atividade em outros substratos, incluindo DNA e RNA de células eucarióticas. *M. dispar* e o *M. penetrans*, por exemplo, produzem cápsula (glicocálice) que suprime funções dos macrófagos alveolares contribuindo na imunossupressão local. As hemolisinas são produzidas por vários micoplasmas, no entanto são poucas as evidências sobre a função direta destes compostos na indução de doenças. As toxinas produzidas por cepas de *M. mycoides subsp. capri*, demonstraram citopatogenicidade em células embrionárias de traquéia de galinhas. Endotoxinas foram demonstradas em cinco espécies de *Acholeplasma* caracterizadas como lipoglicanos, moléculas complexas constituídas de vários açúcares neutros, amino-açúcares, glicerol e ácidos graxos (ROTTEM, 2003). Estas moléculas são diferentes dos lipopolissacarídeos-LPS das bactérias Gram negativas. Estes compostos foram consideradas mais potentes do que o LPS de *Escherichia coli*. O *M. gallisepticum* sintetiza diferentes substâncias solúveis neurotóxicas, provocando uma síndrome neurológica letal com lesões histopatológicas primárias nas artérias cerebrais de perus. As lesões histopatológicas se caracterizam pelo edema nos capilares cerebrais, os quais provocam oclusão vascular resultando em fibrose necrótica. No caso do *M. bovis*, uma fração polissacáride foi descrita como citotóxica. Finalmente, a neurotoxina produzida pelo *M. neurolyticum* seletivamente altera a permeabilidade das células endoteliais dos capilares do cérebro, produzindo a clássica e fatal “rolling disease” em camundongos. Ocorre uma sintomatologia nervosa típica, fazendo o animal girar ao longo do eixo do corpo e desenvolver paralisia ascendente progressiva. Esta afecção não deve ser confundida com a freqüente labirintite causada por *M. pulmonis* principalmente nos ratos de laboratório (BLANCHARD; BROWING, 2005).

2.6 DIAGNÓSTICO

A correta identificação e classificação dos microrganismos são de extrema importância prática, não só no aspecto clínico, mas também, na fitopatologia, biotecnologia e estudos ambientais.

A tipificação permite caracterizar a diversidade dos microrganismos existentes na Natureza, contribuindo para a sua classificação e a discriminação entre indivíduos da mesma espécie. A tipagem de microrganismos progrediu consideravelmente nos últimos anos, em resultado do desenvolvimento de técnicas moleculares que fazem uso da variação encontrada genoma. O advento da tipagem molecular permitiu não só grandes avanços nos domínios da identificação, classificação e diagnóstico, mas também no estudo da evolução e filogenia dos microrganismos. Antes do desenvolvimento das diversas técnicas de tipagem molecular, os procedimentos que permitiam fazer a distinção de isolados bacterianos baseavam-se principalmente na comparação do fenótipo, ou seja, de características observáveis (DI CASTRI; YONES, 1990).

Os métodos usados na discriminação de gêneros, espécies e estirpes de microrganismos podem ser divididos em métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos de tipagem recorrem a testes morfológicos e bioquímicos, sensibilidade a fagos, sensibilidade a bacteriocinas, perfis imunológicos e perfis de susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Apesar da sua grande utilidade na determinação do gênero e da espécie, a aplicabilidade destes métodos ao nível de sub-espécie (conjunto de estirpes) é muito limitada, devido ao fato de caracterizarem o fenótipo e não o genótipo, os resultados obtidos por estes métodos dependem fortemente das condições ambientais e são aplicáveis na tipagem de algumas espécies apenas (JOHASSON; PETTERSSON, 2002).

Macromoléculas como os ácidos nucleicos e as proteínas contêm informação e diversidade suficiente nas suas seqüências para permitirem uma abordagem uniforme e simples com vista ao estudo da diversidade microbiológica. A análise de proteínas, embora tenha vindo a ser utilizada com algum sucesso em tipagem, apresenta também a limitação de apreciar a expressão de genes na dependência das condições ambientais, enquanto que a informação correspondente ao genótipo

não é afetada por modificações ambientais e fisiológicas. Por isso, são utilizados predominantemente métodos de tipagem baseados em análise de ácidos nucleicos.

Os métodos de tipagem molecular analisam uma parte ou a totalidade do genoma por estes são conhecidos como métodos de genotipagem. Baseiam-se no polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição gerados a partir do genoma de diversos microrganismos em comparação. Um sistema eficiente de tipagem molecular deverá ter um elevado poder discriminatório, ou seja, permitir a diferenciação clara de um elevado número de estirpes e possuir elevada reprodutibilidade. Nem todos os métodos são igualmente eficazes, diferindo, nomeadamente, no poder discriminatório e na distinção que permitem obter vários níveis taxonomicos. Os métodos existentes variam ainda de acordo com a simplicidade/dificuldade, rapidez, custos associados e necessidade de equipamento e técnicos qualificados. A adequação de um método de tipagem depende, portanto, do fim a que este se destina (identificação, classificação, diferenciação, etc).

A identificação e diagnóstico laboratorial das infecções por mollicutes têm sido baseados em testes bacteriológicos clássicos, incluindo morfologia, características da colônia, propriedades fisiológicas e sorológicas. Testes de análise molecular do DNA genômico, RNA ribossomal, proteínas celulares e lipídeos parecem estar prevalecendo na identificação, particularmente devido ao lento crescimento e/ou à características individuais de exigências por algumas espécies (RAZIN, 2002).

O diagnóstico laboratorial rápido e específico é necessário para o monitoramento das doenças causadas por micoplasmas. Na rotina laboratorial, a detecção do agente ainda é baseada no isolamento e sua caracterização. A identificação é presuntiva, baseada principalmente pela fermentação da glicose, hidrólise da arginina ou uréia e formação de filmes e manchas associada à origem da amostra clínica. Os métodos sorológicos de identificação, como a inibição de crescimento e a imunofluorescência, permitem a identificação definitiva da espécie (GOLL, 1994).

Para os micoplasmas de origem animal, há diferentes meios de culturas otimizados para o crescimento de cada espécie ou para um pequeno grupo de mollicutes. Geralmente, os meios apresentam em sua constituição uma base rica em nutrientes, antibióticos e outras substâncias para evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis. Embora as composições dos meios de cultura sejam similares, existem variações para o isolamento de uma espécie ou outra. O

isolamento, cultivo e identificação de micoplasmas são difíceis e podem demorar quatro semanas ou mais. O meio de cultivo é de alto custo e as coletas das amostras clínicas de mais de um sítio anatômico nos animais com infecções subclínicas, devem ser realizadas (SIMECKA et al., 1992).

Entre os testes recentemente descritos no diagnóstico de doenças infecciosas em animais, muitos são métodos melhorados utilizados há décadas, incluindo-se os métodos imunohistoquímicos e imunoenzimáticos.

Por algum tempo, a diferenciação de cepas para fins epidemiológicos só era possível por meio de métodos clássicos como reações bioquímicas, sorológicas, de fagotipagem ou pelo padrão de sensibilidade e resistência a agentes antimicrobianos. Porém, estas técnicas são interpretadas como características não tipáveis e podem mostrar baixa reprodutibilidade (VESSALIC et al., 1993).

A tipagem de microrganismos e a capacidade de identificá-los ao nível da espécie, e discriminar entre indivíduos da mesma espécie conheceu grandes avanços nos últimos anos. O desenvolvimento de técnicas moleculares de tipagem de microrganismos ampliou as possibilidades nos campos da classificação, identificação e diagnóstico. O conhecimento sobre a filogenia e evolução dos microrganismos foi também grandemente ampliado (JOHASSON; PETTERSSON, 2002).

Métodos baseados na aplicação de tecnologia de DNA recombinante, tal como hibridização de DNA/RNA e reação em cadeia da polimerase (PCR), estão sendo aplicados em diversos setores da pesquisa biomédica e no diagnóstico laboratorial. A tecnologia de hibridização de DNA tem sido aplicada com êxito para detectar microrganismos de crescimento lento com importância veterinária (BUZINHANI, 2006).

As técnicas de diagnóstico molecular são usualmente indicadas para o uso rotineiro na detecção de microrganismos que crescem lentamente, *in vitro*, requerem meio de cultura complexo e tempo de incubação prolongado. No caso dos *Mollicutes*, os parâmetros de dificuldade de crescimento evidenciam a necessidade do uso rotineiro de técnicas moleculares na sua detecção (RAZIN et al., 1987).

A introdução da tecnologia genética no estudo dos micoplasmas vem assessorando na classificação de novas espécies, desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e auxílio no conhecimento dos processos pelos quais esses

microrganismos alteram a integridade fisiológica das células hospedeiras (YAMAMOTO et al., 1994; DYBVIG; VOELKER, 1996).

Os métodos fenotípicos caracterizam os produtos da expressão gênica de forma a diferenciar as cepas. Os métodos genotípicos são aqueles que se baseiam na análise de uma estrutura genética do microrganismo e são caracterizados pela fragmentação do cromossomo por enzimas apropriadas, ou pelo estudo de DNA extracromossômico. Os métodos genotípicos apresentam menor variação natural, no entanto, podem ser afetados por inserções ou deleções do DNA, por ganho ou perda de DNA extracromossômico ou por mutações aleatórias que criam ou eliminam sítios de reconhecimento, alterando a ação das endonucleases de restrição (TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997; TAMBIC, et al., 1999).

Freqüentemente, surtos de doença infecciosa é resultado da exposição a uma fonte comum de um agente etiológico. Epidemiologicamente, os microrganismos envolvidos possuem uma origem comum e são clones muito semelhantes, isto é, membros da mesma espécie que apresentam fatores de virulência, características bioquímicas e genômicas análoga. No entanto, existem diversidades em nível de espécies, onde microrganismos isolados de diferentes fontes, tempos e regiões geográficas podem ser diferenciados ou classificados em subtipos ou cepas. O processo de subtipagem é importante na epidemiologia para o reconhecimento de surtos infecciosos, detecção de transmissão cruzada de patógenos nosocomial, determinação da fonte de infecção, reconhecimento de cepas virulentas e monitoramento de programas de vacinação (OLIVE; BEAN, 1999).

O processo de subtipagem tem sido realizado por diferentes métodos que devem respeitar critérios para serem amplamente utilizados. Todos os microrganismos pertencentes à mesma espécie devem ser tipificados pelo método escolhido, com exceção de alguns métodos baseados em reações com anticorpos e receptores de bacteriófagos que são características que podem não estar presente em todos os membros da mesma espécie. As metodologias devem apresentar alto poder de diferenciação e possuir reprodutibilidade. Viabilidade no custo e aplicação devem ser aspectos considerados na escolha da técnica a ser utilizada na tipificação (ARBEIT, 1995).

Técnicas derivadas da PCR podem ser aplicadas, como Amplificação Randômica Polimórfica de DNA (RAPD), também chamadas de reação em cadeia

da polimerase, utilizando iniciadores ou “primers” arbitrários (AP-PCR) (WELSH; MCCLELLAND, 1990; MENARD et al., 1992). Esta técnica permite a tipificação genotípica de microrganismos eucarióticos ou procarióticos, detecção de polimorfismo em mapeamento de populações, nos estudos filogenéticos de microrganismos e no diagnóstico diferencial (MENARD et al., 1992; WELSH et al., 1995).

A RAPD e PCR utilizando “primers” arbitrários são baseados na utilização de uma pequena seqüência de “primers”, com nove a 10 bases, que hibridizam com suficiente afinidade a seqüência de DNA cromossomal a baixas temperaturas de anelamento nos ciclos iniciais de amplificação. O número e localização dos sítios dos “primers” arbitrários variam nas diferentes amostras de uma espécie e desta forma, os produtos amplificados separados na eletroforese em gel de agarose, resultam em um perfil de fragmentos característico para cada amostra bacteriana (WELSH; MCCLELLAND, 1990). Em muitos casos as seqüências dos “primers” do RAPD que geram melhor perfil de DNA para a diferenciação são empiricamente determinadas.

A metodologia da RAPD é mais discriminatória quando comparada com a análise por RFLP, mas menos discriminatória que Rep-PCR (VILA et al., 1996). Alguns problemas relacionados à reprodutibilidade e padronização da RAPD têm sido relatados devido a eventos de hibridizações imperfeitas entre o “primer” e o sítio alvo. O processo de amplificação é extremamente sensível a mudanças na temperatura de anelamento que pode resultar em variabilidade no perfil de fragmentos. O uso de “primers” desenhados empiricamente, faz com que cada um tenha condições de reações e reagentes próprios, dificultando assim a padronização da técnica (MEUNIER; GRIMONT, 1993).

O RFLP é uma identificação de sítios de enzimas de restrição específicos que revelam diferenças no perfil de fragmentos do DNA de um determinado microrganismo. No RFLP, as enzimas de restrição são usadas para cortar o DNA em sítios de reconhecimento específico composto por quatro a seis pares de bases (pb). A amostra de DNA é cortada com uma ou mais enzimas de restrição e os fragmentos resultantes são separados de acordo com o tamanho molecular usando eletroforese em gel. Diferenças na extensão dos fragmentos resultam da substituição de bases, adição, deleção ou rearranjos dentro da seqüência de reconhecimento da enzima de restrição. Embora dois indivíduos da mesma espécie

tenham idênticos genomas, eles sempre serão diferentes em alguns poucos nucleotídeos. Algumas destas diferenças produzem novos sítios de restrição e o perfil de bandejamento é então modificado.

É necessário testar diferentes enzimas para cada microrganismo até que se encontrar uma que gere um perfil de fragmentos diferentes. A RFLP é útil em estudos de variações intra-específicas, e a presença ou ausência de fragmentos resultantes de mudanças no sítio de reconhecimento serão usadas na identificação de espécies ou populações.

A técnica de PFGE foi desenvolvida por Schawartz e Cantor (1984) como um instrumento para investigação de DNA cromossômico de células eucariontes e posteriormente descrita como um eficiente método para tipagem de muitas cepas bacterianas (TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997). É uma variação da eletroforese convencional em gel de agarose (WEBER et al., 1997). A orientação do campo elétrico é alterada ou pulsada periodicamente, e as moléculas de DNA respondem orientando-se continuamente mudando a direção de migração através do gel de agarose (TENOVER et al., 1997; GOERING, 1998). Esta técnica pode ser utilizada tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas e é considerada altamente discriminatória e reprodutível para cepas endêmicas e epidêmicas (MORETTI-BRANCHINI et al., 1993; TENOVER et al., 1995).

Devido à diversidade e estabilidade de perfis de DNA genômico, a técnica de PFGE tem sido muito precisa para tipagem epidemiológica de cepas (ALFIZAH et al., 2002), sendo considerada padrão ouro devido ao seu alto poder discriminatório entre cepas (OLIVE; BEAN, 1999).

A utilização da análise pela enzima de restrição, que cliva o DNA em inúmeros fragmentos através da técnica de PFGE tem sido muito recomendada para tipagem. A técnica de PFGE tem sido amplamente utilizada para estudo de vários microrganismos envolvidos em surtos de infecções. Para cada espécie, deve ser aplicada a enzima de restrição que melhor aponte as variações entre cepas e, no caso de micoplasma, há um consenso entre os pesquisadores de que a enzima *SmaI* é a mais indicada (STRUELENS et al., 1993; VAN-BELKUM et al., 1998, BUZINHANI, 2006). Essas enzimas de restrição podem reconhecer seqüências de nucleotídeos curtas (quatro nucleotídeos) ou longas (seis nucleotídeos) no cromossoma bacteriano. Quando se reconhece seqüências de nucleotídeos longas produzirá um número menor de bandas, reduzindo a complexidade na análise dos

perfis ou padrões cromossômicos. No entanto, estas enzimas geram fragmentos grandes de DNA ($\geq 50\text{Kpb}$) que podem ser separados num sistema de eletroforese com campos elétricos alternados, devendo ser aplicado um pulso fixo (SADER et al., 1994; TENOVER et al., 1997; TAMBIC et al., 1999).

Para a interpretação dos resultados obtidos por PFGE, Struelens et al. (1993) propuseram os termos variantes subclonais para aquelas cepas que apresentaram entre 70 a 100% de similaridade em seus perfis de macrorestrição, e diversidade clonal para cepas com menos de 70% de similaridade. Tenover et al. (1995) determinaram os seguintes critérios de interpretação para as categorias de relação genética e epidemiológica: isolados iguais, muito relacionados, possivelmente relacionados e isolados não relacionados.

O critério de interpretação para a tipagem de bactérias utilizando o método de PFGE permitiu as definições de padrões de similaridade entre cepas bacterianas (TENOVER et al., 1995; GOERING, 1998; BLANC et al., 2001). O PFGE apresenta importantes vantagens quando comparado com outras técnicas de tipagem molecular (GOERING, 1998; TENOVER et al., 1997). Todos os métodos podem ser caracterizados em termos de tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade de realização e de interpretação, porém com diferentes custos (TENOVER et al., 1997; TAMBIC et al., 1997; WANG et al., 2002).

O grau de discriminação oferecido pela tipagem do DNA de bactérias depende da divergência genética evolucionária, seguida de mutações não letais, aquisição ou deleção de fragmento de DNA durante os anos (HARTSTEIN, 1999). A habilidade dos métodos moleculares de tipagem em distinguir isolados epidemiologicamente não relacionados é reflexo da variação genética observada no DNA cromossômico das espécies bacterianas, sendo geralmente esta variabilidade alta (JOHASSON; PETTERSSON, 2002).

A tipabilidade refere-se à habilidade da técnica em produzir um resultado de tipagem para cada isolado. Isolados não tipáveis são aqueles que não produzem resultado. Um método para ser considerado reprodutível deve gerar os mesmos resultados quando uma mesma cepa for testada em repetidos ensaios laboratoriais. O poder discriminatório refere-se à capacidade da técnica em diferenciar isolados não relacionados epidemiologicamente. Idealmente, o método de tipagem deve ser capaz de reconhecer os isolados não relacionados, fornecendo resultados que nos permitam classificá-los como pertencentes a um único perfil ou não (MASLOW et al.,

1993; SADER et al., 1994; TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997; ALFIZAH et al., 2002).

A facilidade de realização reflete o custo dos reagentes apropriados, do equipamento, da complexidade do método e do esforço requerido para o aprendizado e a realização prática da técnica (TAMBIC et al., 1999; TENOVER et al., 1995; TENOVER et al., 1997). A facilidade de interpretação envolve a obtenção de um resultado, prevendo a clareza, a objetividade e a fácil compreensão (SAULNIER et al., 1993; VAN BELKUM et al., 1998).

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) envolve a síntese enzimática específica de DNA ou RNA por meio de um sistema semi-automático, *in vitro*, de milhões de cópias de um segmento. Esta técnica tem sido utilizada para diagnóstico de doenças infecciosas e empregada como ferramenta na investigação epidemiológica de vários microrganismos (TAMBIC et al., 1999).

A técnica PCR baseia-se na amplificação de uma seqüência específica do cromossoma. O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar “primers” mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de seqüência. Welsh e McClelland (1990), por sua vez, propuseram a denominação mais apropriada para AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), uma vez que os iniciadores possuem seqüência arbitrária e a amplificação não ocorre ao acaso, mas sim em lugares específicos no genoma.

A distinção entre cepas bacterianas altamente relacionadas dificilmente é revelada quando se usam “primers” específicos. Uma variante da PCR convencional muito aplicada e que tem sido utilizada com sucesso nos estudos envolvidos em epidemias ou surtos hospitalares é o “Random Amplified Polymorphic DNA” – RAPD (MULLIS, 1990; TAMBIC et al., 1999). Ensaios de RAPD envolvem a amplificação simultânea de vários locos anônimos no genoma utilizando iniciadores de seqüência arbitrária, sendo descrito e desenvolvido primeiramente por Williams et al. (1990) e Welsh e McClelland (1990). A técnica RAPD é baseada no uso de iniciadores com seqüências curtas de nove a 10 bases de comprimento que hibridizam com uma afinidade suficiente a seqüência de DNA cromossômico em baixa temperatura de anelamento, esses iniciadores podem ser usados para amplificação inicial na região do genoma da bactéria (OLIVE; BEAN, 1999). Porém, usando-se iniciadores

aleatórios ou inespecíficos, torna-se possível o estudo epidemiológico por não ser necessário o conhecimento preliminar das seqüências genéticas a serem amplificadas.

O RAPD permite a análise das amplificações do rDNA das bactérias quando não se têm informações de suas bases (MASLOW; MULLIGAN, 1996; TAMBIC et al., 1999). Muitos estudos reportaram sucesso no uso de RAPD para distinguir cepas bacterianas (SAULNIER et al., 1993; ARBEIT, 1999; FACKLAN et al., 1999). Em estudos de epidemiologia molecular, o RAPD se rivaliza com a PFGE na preferência dos especialistas, pois o poder discriminatório, a facilidade de execução da técnica e a rápida disponibilidade dos resultados contribuí para a sua popularidade (WELSH; MCCLELLAND, 1990; TAMBIC et al., 1997; WANG et al., 2002). No entanto, quando se estudam surtos epidemiológicos, por este método, se faz necessário o emprego em conjunto a outras técnicas de tipagem molecular (TAMBIC et al., 1999), pois o RAPD tem mostrado baixa reprodutibilidade (ARBEIT, 1999; FACKLAM et al., 1999).

A Amplificação de Fragmentos Polimórficos (Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP) é baseada na amplificação seletiva de fragmentos de DNA gerados pela digestão enzimática (VOS et al., 1995; MCLAUCHLIN et al., 2000). O perfil de fragmento é mais complexo que outras metodologias, aumentando o poder discriminatório entre as amostras analisadas. A estratégia no uso de duas enzimas e amplificação seletiva proporciona uma extraordinária flexibilidade no protocolo de tipagem para um dado agente microbiano. Estudos têm demonstrado que o AFLP é reprodutível e tem habilidade na diferenciação de amostras derivadas do mesmo clone (JANSSEN et al., 1996; KOELEMAN et al., 1998).

A discriminação entre microrganismos semelhantes pode também ser efetuada através da determinação das seqüências nucleotídicas de genes evolutivamente conservados. Desta forma, é possível detectar diferenças entre clones. O seqüenciamento de uma porção do DNA vem sendo aplicado por exemplo, na epidemiologia molecular de doenças bacterianas. Para esse efeito, utiliza-se a reação de PCR para amplificar os genes que se destinam ao seqüenciamento. As seqüências alvo incluem genes para proteínas de superfície, resistência a antibióticos e, mais freqüentemente, o 16S rRNA. Por vezes o seqüenciamento é usado em conjunto com outros métodos de tipagem, nomeadamente PFGE, permitindo examinar a transferência horizontal de genes entre clones da mesma espécie. Este método, embora mais dispendioso, é muito útil para identificar e

discriminar microrganismos de difícil cultivo. O método pode ser aplicado a culturas complexas em que, por vezes, alguns dos componentes da população são difíceis ou impossíveis de cultivar. Para esse efeito, os fragmentos resultantes da amplificação pela PCR podem ser clonados num vetor apropriado, introduzidos em *E. coli* e, após a seleção dos transformantes, os insertos presentes em diferentes clones são sujeitos à determinação da sequência nucleotídica (JOHASSON; PETTERSSON, 2002; ALVES et al., 2003).

Assim são possíveis dois procedimentos alternativos (Figura 2):

- i) amplificação por PCR e sequenciamento direto dos fragmentos amplificados, sem necessidade de clonagem;
- ii) clonagem dos fragmentos amplificados procedendo-se depois à determinação das sequências dos insertos individuais.

O primeiro procedimento é normalmente utilizado para microrganismos em cultura pura e abundante, o segundo, para culturas mistas ou microrganismos de difícil cultivo.

Figura 2. Os dois procedimentos mais utilizados para caracterizar sequências nucleotídicas com fins de identificação e/ou discriminação de microrganismos

Fonte: Alves et al., (2003)

Antes de 1975, praticamente nem se concebia a tentativa de seqüenciar cromossomos acreditava-se ser uma tarefa laboriosa requerendo muitos anos de trabalho. No final de 1976, o cromossomo inteiro do fago X174, de 5.387 nucleotídeos tinha sido seqüenciado. Hoje é possível obter seqüências de nucleotídeos de genes de cromossomos eucarióticos inteiros, e estes dados são armazenados em bancos de dados em computadores para referência posterior. Foram desenvolvidas nesta época, quase que simultaneamente, duas técnicas que promoveram uma revolução na "arte" de seqüenciar DNA. Uma utilizando enzimas de restrição associadas ao aperfeiçoamento da eletroforese em gel para diferenciação de fragmentos de DNA e a outra na clonagem de gene, viabilizaram os seqüenciamentos (ALVES et al., 2003).

Em 1975, Sanger et al., desenvolveram um método enzimático com terminadores de cadeia específicos, para gerar quatro populações de fragmentos que terminam em As, Gs, Cs e Ts, respectivamente. O importante nesta técnica de seqüenciamento é usar a relação correta do didesoxirribonucleosídeo trifosfato normal de didesoxirribonucleosídeo trifosfato terminador. A relação de 100 desoxirribonucleosídeos trifosfatos para um didesoxirribonucleosídeo trifosfato normalmente dá a frequência de terminação desejada em cada sítio potencial de terminação. Os produtos são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e as posições dos produtos de reação radiativos (cadeias nascentes de DNA) são determinadas por autorradiografia.

Atualmente não são utilizados nucleotídeos radioativos. Os didesoxinucleotídeos são marcados com substâncias fluorescentes que emitem comprimentos de onda diferentes. Desta forma, os fragmentos que incorporam estes nucleotídeos podem ser identificados após excitação com laser por emissão de sua fluorescência. Isso possibilita que a reação seja feita em um único tubo. Além disso, são utilizadas enzimas termoestáveis. A reação, que não é uma amplificação apenas extensão, é realizada de forma cíclica. Isso faz com que possam ser obtidas seqüências a partir de uma quantidade menor de DNA e também auxilia no seqüenciamento de regiões que possuem estruturas que, em temperaturas mais baixas, impedem a ação das polimerases. A utilização de temperaturas mais altas (70°C) evita este problema. Atualmente são utilizados seqüenciadores automáticos que permitem a realização de seqüências em larga escala (TENOVER, 1997).

Uma das contribuições mais valiosas da tecnologia genética para a pesquisa biológica consiste na possibilidade de clonagem de seqüências de DNA. Para isto, um fragmento de DNA de qualquer origem é incorporado em um plasmídeo pequeno, com o qual o hospedeiro (em geral a *Escherichia coli*) será transformado. Este plasmídeo, incluindo o fragmento de DNA nele incorporado, se reproduz no hospedeiro, originando certo número de cópias de si e conseqüentemente do DNA estranho. O uso de enzimas de restrição é um dos passos essenciais desta técnica; com elas o preparado de DNA em questão é clivado em fragmentos precisamente definidos. Se a enzima de restrição usada for do tipo que cliva as duas fitas do dúplex assimetricamente, os fragmentos por ela originados possuirão extremidades em fita única, com seqüências complementares idênticas. Em temperaturas fisiológicas, os cortes realizados pela enzima de restrição nas fitas de DNA, mesmo que deslocadas algumas bases, causam uma quebra irreparável no dúplex: as poucas pontes de hidrogênio restantes não são o bastante para manter os fragmentos juntos. Em temperaturas mais baixas, quando o movimento térmico das moléculas é menor, algumas poucas pontes de hidrogênio já são suficientes para manter a união da estrutura (OLIVE; BEAN, 1999).

A conseqüência prática é que os fragmentos, só por resfriamento, se “colam” uns aos outros devido a renaturação das curtas extremidades em fita única (resultado da clivagem por enzimas de restrição). Por meio da enzima ligase, a continuidade dessas fitas pode ser restaurada juntando dessa forma duas fitas de DNA de origens diferentes. Quando se une um pedaço qualquer de DNA a um plasmídeo, mantendo a possibilidade de se propagar indefinidamente este DNA, dá-se o nome de “clone”.

Nem sempre a eficiência com que o DNA a ser clonado é incorporado ao plasmídeo é satisfatória. Por isso desenvolveram-se diferentes sistemas seletivos para as situações desejadas. Por exemplo, pode-se escolher como veículo de clonagem um plasmídeo contendo um fator de resistência a um antibiótico, de modo que, em meio contendo o antibiótico, em questão, somente os hospedeiros que aceitaram o plasmídeo com o fator de resistência podem formar colônias. O plasmídeo com o fator de resistência, para ser interessante neste caso, tem que estar carregando o DNA a ser clonado. Para se distinguir entre veículos com ou sem o DNA exógeno, pode-se utilizar um outro fator no plasmídeo localizado no ponto de ação da enzima de restrição. Se a estrutura anelar do plasmídeo for restaurada e o

gene indicador voltar a sua função normal, então o veículo está sem o DNA estranho; porém se o fragmento de DNA tiver sido inserido nesse ponto, o gene indicador perde sua função. Para este segundo indicador pode-se utilizar outra resistência a antibióticos: as colônias crescidas no primeiro meio seletivo podem ser transferidas para outro meio, pela técnica de carimbo, testando assim sua resistência ao segundo antibiótico. Hoje vários outros métodos foram desenvolvidos para se confirmar a presença de um fragmento inserido em um plasmídeo, todavia, a maioria se baseia nesse princípio de possuir um gene indicador no sítio de restrição onde será feita a clonagem. Recentemente têm-se utilizado genes “suicidas”, os quais, se não forem interrompidos por um DNA clonado, produzirão proteínas tóxicas para a célula. Portanto, apenas serão viáveis colônias portando plasmídeos recombinantes (MONTESINOS et al., 2002).

A primeira clonagem foi feita no ano de 1973 por Stanley Cohen e Herbert Boyer, e inicialmente feitas usando-se como inserto fragmentos de DNA resultantes de clivagem de DNAs totais, dessa forma, o rendimento das clonagens era muito baixo. A técnica de PCR veio como um grande aliado para a clonagem, pois com ela, pode-se clonar ampliações, aumentando assim o rendimento (devido ao aumento no número de insertos) e a confiabilidade do experimento. Várias técnicas utilizam essa ferramenta, entre elas pode-se citar o seqüenciamento de DNA e a produção de proteínas em laboratório.

Dessa forma as técnicas de tipagem molecular de microrganismos baseados na análise do DNA representam atualmente um recurso fundamental e valioso no estudo epidemiológico, permitindo uma diferenciação maior entre isolados bacterianos (BINGEN, 1994; MASLOW et al., 1993; OLIVE; BEAN, 1999; MONTESINOS et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- isolamento de bactérias pertencentes a classe *Mollicutes* a partir do material biológico do trato reprodutivo das espécies caprina e ovina e tipificação genotípica dos isolados.

3.2. Específicos:

- Isolamento de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp., por meio de cultivo em meios específicos SP4 e UB, de amostras clínicas de mucovulvovaginal e sêmen das espécies caprina/ovina, sadios e com distúrbios reprodutivos.

- detecção de micoplasmas pela PCR, utilizando-se “primers” que identifiquem qualquer gênero pertencente à classe *Mollicutes* e PCR Espécie-específico para identificação *M. arginini* e *Acholeplasma laidlawii*, em materiais biológicos de machos e fêmeos das espécies caprina/ovina.

- utilização da PFGE para avaliação de diferenças genotípicas entre isolados de ureaplasma do trato reprodutivo de machos e fêmeas das espécies caprina/ovina, sêmen de touro e cepas de referências *U. diversum* – 449783 ATCC e 449782 ATCC – e *U. urealyticum* (T960).

- seqüenciamento do gene 16S rRNA de *Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp. isolados de amostras clínicas de mucovulvovaginal e sêmen das espécies caprina/ovina para avaliar e comparar o perfil genotípico dos isolados obtidos aos ureaplasma e micoplasma de outras espécies animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPAS DE REFERÊNCIA

M. bovis (Donetta), *M. capricolum* (GM262G), cedidas pelo Prof. Dr. Elmiro Rosendo Nascimento (Universidade Federal Fluminense), *M. arginini* – GM40, *Acholeplasma laidlawii* PG–8, *U. diversum* – 49783 ATCC, *U. diversum* – 49782 ATCC, *U. urealyticum* (T960) e um isolado de Touro, cedido pela Profa. Dra. Melissa Buzinhani.

4.2 MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados meios específicos (Anexo A e B), líquido e sólido, para micoplasma e ureaplasma, destinados ao cultivo das cepas de referência, e isolados obtidos do material clínico. No cultivo de micoplasma, utilizou-se o Meio SP4 (TULLY, 1995) e, para ureaplasma, o Meio UB (RUHNKE; ROSENDAL, 1994), acrescidos de CRML[®]. Na avaliação das características morfológica das colônias, foram utilizados os mesmos meios (SP4 e UB), acrescidos de ágar (1%).

Para o transporte das amostras clínicas, foram utilizados 3mL de cada meio (SP4 e UB), acondicionados em tubo, com tampa rosqueada, estéril (capacidade: 15mL). Os tubos foram transportados, sob refrigeração, e encaminhados ao laboratório para análise, em um período inferior a 16 horas.

4.3 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram coletadas amostras clínicas em 17 propriedades: sendo 15 do estado de São Paulo, uma de Pernambuco e uma de Minas Gerais, no período de setembro de 2005 a maio de 2007.

As coletas de muco vulvovaginal foram realizadas em 120 ovelhas e 98 cabras, 50% sadias, de cada espécie, e 50% com sinais clínicos como: corrimento, vulvovaginite, infertilidade, repetição de cio, aborto ou natimorto.

As fêmeas selecionadas foram submetidas à higiene da região externa da vulva, com água, e secagem por meio de papel toalha. As amostras de muco vulvovaginal foram coletadas em duplicata, com auxílio de suabes, friccionados na parede do vestíbulo vulvar. A haste de cada suabe foi cortada e a extremidade contendo o material biológico depositada em tubo contendo meio líquido SP4 (micoplasma) e UB (ureaplasma).

Foram coletadas amostras de sêmen de 11 ovinos (sete sadios) e 23 caprinos (12 sadios). Os animais classificados como doentes apresentavam sinais clínicos como: orquite, degeneração testicular e baixa motilidade dos espermatozoides. As amostras de sêmen foram coletadas pelo método de eletroejaculação e acondicionadas como descrito para o material de clínico obtido de fêmea.

4.4 CULTIVO DE *Mycoplasma* spp. E *Ureaplasma* spp. DE AMOSTRAS CLÍNICAS

Os meios SP4 e UB utilizados no transporte, contendo a extremidade do suabe, foram homogeneizados e o suabe utilizado diretamente para semeadura em estrias sobre o meio sólido (1% de ágar) SP4 e UB e descartado em seguida. Um mL de cada meio de transporte, contendo a amostra, foi filtrado em membrana 0,45µm obtendo-se aproximadamente 600 a 800µL. Do filtrado, 200µL foram inoculados em 1,8mL de meio (UB e SP4), homogeneizados e realizadas mais três diluições decimais de cada amostra. Da última diluição (10^{-4}), foram retirados 50µL e semeados em meio sólido (1% de ágar) SP4 e UB.

Da amostra de sêmen, 50µl foram retirados para a semeadura direta em meio sólido SP4 e UB e o restante centrifugado a 16000 xg/10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento homogeneizado em aproximadamente 5mL de PBS (2,6mM NaH₂PO₄; 7,4mM NaHPO₄; 14mM NaCl; pH 7,2). Dos 5mL (PBS+sêmen), um mL foi filtrado em membrana 0,45µm, obtendo-se 400 a 600µl. Do filtrado, 200µl

foram inoculados em 1,8mL de meio (UB e SP4) Da última diluição (10^{-4}), foram retirados 50 μ L e semeados em meio sólido (1% de ágar) SP4 e UB.

Os meios líquidos e sólidos foram incubados a 37°C em microaerofilia (SP4) e aerobiose (UB) e observados diariamente por até 30 dias.

Os micoplasmas foram caracterizados inicialmente pela produção de colônias em forma de “ovo frito”, formação de filmes e manchas e por suas bases metabólicas, como a utilização de glicose e/ou arginina, evidenciado pela alteração de pH (RAZIN; TULLY, 1983).

Os ureaplasmas foram caracterizados pela mudança de cor no meio de cultura, acrescido do indicador de pH (vermelho de fenol), devido à hidrólise da uréia, e pela presença de pequenas colônias granulosas de coloração marrom escuro no ágar, conseqüente da precipitação de cátions de manganês pela atividade da urease (RUHNKE, 1994).

Dois mL da amostra de muco vulvovaginal e 4mL da solução de sêmen/ PBS foram divididos em alíquotas de um mL e 2mL, respectivamente destinados à extração de DNA e contraprova.

4.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As amostras clínicas e culturas das cepas de referência foram submetidas à extração do DNA, destinados a amplificações por meio da PCR com “primers” para detecção de *Mollicutes* e Espécie- Específico.

4.5.1 Extração de DNA das cepas de referências e do material clínico

Culturas das cepas de referência (20mL) e do material clínico foram submetidas a extração de DNA por fervura, como descrito por Fan et al. (1995). Foram realizadas centrifugações das amostras de muco vulvovaginal (um mL) e sêmen (dois mL), a 16000 xg /10 min., seguida de duas lavagens do sedimento, uma

com 500µl de PBS e outra com 200µl. O sedimento obtido foi homogeneizado em 70µl de PBS, fervido em “banho-maria” por 10 min., submetidos ao choque térmico com gelo por 5 min. e centrifugado a 16000 *xg*/10 min. O sobrenadante (50µl) foi acondicionado em microtubo (500µl) e estocado a -20°C até o momento de uso.

4.5.2 PCR com “primers” para Classe *Mollicutes*

Os “primers” utilizados são complementares à sequência conservada do gene 16S rRNA e detectam qualquer gênero da Classe *Mollicutes* (*Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Ureaplasma* e *Spiroplasma*), descrito por Van Kuppveld et al. (1992). Os “primers” GPO3 e MGSO são complementares, respectivamente, às regiões V2 e V7 e estão nas posições 789 – 5’ e 1055 – 3’ (Quadro 1). A PCR para Classe *Mollicutes* foi utilizada como triagem para a realização das PCRs espécie-específico.

“Primer”	Seqüência	Produto
GPO3	5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATAC CCT-3'	270pb
MGSO	5'- TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'	

Quadro 1 - “Primers” GPO3/MGSO utilizados na reação de PCR com as seqüências de nucleotídeos e o tamanho do produto amplificado

A reação foi desenvolvida para um volume total de 50µl, contendo na mistura: 5µl de tampão (10x concentrado) da reação [10mM de Tris-HCl (pH 8,3) e 50mM de KCl], 50pmol de cada “primer”, 1mM de MgCl₂, 2µl com 0,2mM de cada nucleotídeo e 2,5 unidades (U) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®). Para a amplificação foi utilizado um ciclo inicial de 5 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30s. a 94°C (denaturação do DNA alvo), 30s. a 55°C (hibridização dos “primers”) e 30s. a 72°C (extensão dos fragmentos pela *Taq* DNA polimerase), além de um ciclo final de 10 min. a 72°C. A mistura dos reagentes e a adição de 2µl de DNA extraído foram realizadas em salas separadas.

4.5.3 PCR com “primers” espécie-específico para *Acholeplasma laidlawii*

Os “primers” utilizados, descritos por Dussurgett e Dussoix (1994), são complementares à seqüência do gene 16S rRNA, específica para *A. laidlawii* (Quadro 2).

“Primers”	Seqüência	Produto	Localização
UNI	5'- TAATCCTGTTTGCTCCCCAC-3'	505 pb	763 – 782
ACH3	5'-AGCCGGACTGAGAGGTCTAC-3'		277 – 296

Quadro 2 - “Primers” UNI/ACH3 utilizados na reação de PCR com as seqüências de nucleotídeos, tamanho do produto amplificado e localizações

Para a reação em cadeia da polimerase foi adicionado a um microtubo (0,2mL) 40pmol de cada “primer”, 1U de *Taq* DNA polimerase, 1,2mM de MgCl₂, 200μM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 2μl da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50μl. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 95°C por 5 min., 30 ciclos de 95°C por 30 s., 64°C por 1,5 min., 72°C por 1,5 min. e um ciclo final de 72°C por 10 min.

4.5.4 PCR com “primers” espécie-específico para *Mycoplasma. arginini*

Os “primers” utilizados, descrito por Lauerman (1998), são complementares à seqüência do gene 16S do rRNA específica para *M. arginini* (Quadro 3).

“Primers”	Seqüência	Produto	Localização
MAGF	5'-GCATGGAATCGCATGATTCCT-3'	511 pb	215 – 240
GP4R	5'-GGTGTTCTTCCTTATATCTACGC-3'		726 – 704

Quadro 3 - “Primers” MAGF/GP4R utilizados na reação de PCR com as seqüências de nucleotídeos, tamanho do produto amplificado e localizações

Para a reação em cadeia da polimerase, foram adicionados a um microtubo

(0,2mL) 20pmol de cada “primer”, 1,25U de *Taq* DNA polimerase, 2,0mM de $MgCl_2$, 50 μ M de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 2 μ l da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 μ l. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: 40 ciclos a 94°C durante 30s., 55°C e durante 30s., 72°C durante 60s. e um ciclo final de 72°C por cinco min.

4.5.5 Detecção do produto amplificado

Os produtos da PCR (10 μ l) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 10 μ g/mL de brometo de etídeo em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2mM EDTA, pH 8,0). A visualização e fotodocumentação dos produtos foram realizadas sob luz ultravioleta (UV). O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). Este procedimento foi empregado em todas as análises dos produtos da PCR.

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE CAMPO PULSADO (PFGE)

A extração do DNA (molécula íntegra) e a digestão com enzima de restrição foram baseadas nos estudos de Buzinhani (2006), com modificações na extração, digestão e corrida eletroforética. Foram utilizadas duas cepas de referência, *U. diversum* 49783 (sorogrupo C) e *U. urealyticum* (T960) para a padronização da PFGE.

O meio de cultura UB foi utilizado nos subcultivos das cepas de referência e dos isolados clínicos de ureaplasma, obtidos de material biológico das espécies caprina/ovina.

Os ureaplasmas, previamente estocados a -70°C, foram subcultivados em meio UB, inoculando-se 200 μ l de cada cultura em 1,8mL de meio líquido, incubados a 37°C. Para aumentar o volume do inóculo, aproximadamente 2,0mL de cultura foram adicionados em 18mL de meio UB. Após crescimento, os 20mL foram inoculados em

100mL. O volume de 120mL, das culturas de ureaplasmas, foi utilizado para a obtenção de DNA destinado a PFGE.

4.6.1 Obtenção do sedimento microbiano

Os ureaplasmas, presentes no volume de 120mL de cultura, foram submetidos a lavagens e solidificação em blocos de agarose para extração de DNA.

As culturas (pH aproximado 8,0) foram centrifugadas a 16280 xg /75 min. para sedimentação. O concentrado foi submetido a duas lavagens seguidas por centrifugações de 20600 xg /40 min. com 2mL de PBS (pH 7,20) e ressuspensão em 300 μ L de Tris-EDTA (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8,0). As suspensões de ureaplasmas (300 μ L) foram homogeneizadas, na proporção de 1:1, em ágar 2% (Bio-Rad®) e distribuídas em suporte plástico (Bio-Rad®), para formação de aproximadamente cinco blocos.

4.6.2 Extração do DNA de ureaplasma contido nos blocos de agarose

A extração foi realizada como descrito por Buzinhani (2006), com modificações no processo. Os blocos, contendo os ureaplasmas, foram transferidos para 5,0mL de Triton-EDTA (1% de Triton-X 114, 0,5M EDTA; pH 8,0) e incubados a 38°C por duas horas. Após esse período, acrescentou-se 2,5mL de EDTA (0,5M) à solução com os blocos (totalizando 7,5mL), que foram incubados a 48°C por 24 horas.

Na digestão protéica, os blocos foram transferidos para 4,5mL de EDTA (0,5 M), 1% de sarcosine e 1mg/mL de proteinase K (Sigma®). A proteinase K foi previamente diluída, em água ultra pura, e estocada a 10mg/mL. Os blocos foram incubados a 55°C por 20 horas e posteriormente submetidos a cinco lavagens, com 10 mL de tampão TE, em agitação por 40 min. a 4°C, e estocados em 0,5% de TBE (45mM Tris base, 45mM Ácido bórico, 1,0mM EDTA, pH 8,30) a 4°C.

Foram testados três tampões de lavagem:

- Tampão TE A: 10mM Tris Base, 1mM EDTA, pH 8,0 (BUZINHANI, 2006);
- Tampão TE B: 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0 (MOSER, 2006);
- Tampão TE C: 20mM Tris Base, 50mM EDTA, pH:8,0 (Manual: CHEF Mapper Dr-III, Bio-Rad®).

4.6.3 Digestão enzimática

A digestão enzimática, do DNA dos ureaplasmas contidos nos blocos, foi realizada pela enzima de restrição *SalI* (BioLabs®). Cada bloco foi depositado em 265µl de água ultra pura, 30µl do tampão de enzima, 3µl de BSA (1mg/mL) e 40 U da enzima e incubado a 37°C (18 horas). Foram testados blocos digeridos pela enzima *SalI* sem BSA.

4.6.4 Padronização dos programas de eletroforese para PFGE

Foram testados diferentes pulsos elétricos e tempos de eletroforese, para ajustar a separação dos fragmentos de DNA das cepas de referência e peso molecular padrão Lambda Ladder (BioLabs®). A voltagem e o ângulo utilizados foram de 6volts/cm e 120°, respectivamente. Foram testados 11 programas, para a eletroforese dos produtos obtidos pela digestão com a enzimas *SalI*, cada um composto de dois estágios.

As eletroforeses foram realizadas em gel com 1,2% de agarose ultrapura (Bio-Rad®), 0,5% de Tampão TBE (45mM Tris base, 45mM Ácido bórico, 1,0mM EDTA, pH 8,30) a 14°C, em aparelho para o sistema de eletroforese em campo pulsado (CHEF Mapper Dr-III, Bio-Rad®). Foram realizadas corridas com e sem adição de Thiourea (Sigma®), na concentração de 150ng/mL, no gel e no tampão de corrida.

Programas utilizados na PFGE para os produtos obtidos pela digestão do DNA, das cepas de referência, com a enzima *SalI* foram:

- Programa I (BUZINHANI, 2006):

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 13 s. e tempo de eletroforese de 18 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 3 a 20 s. e tempo de eletroforese de 2 horas.

- Programa II:

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 8,5 s. e tempo de eletroforese de 16 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 25 a 35 s. e tempo de eletroforese de 2 horas.

- Programa III:

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 5 s. e tempo de eletroforese de 18 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 30 a 40 s. e tempo de eletroforese de 6 horas.

- Programa IV:

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 13 s. e tempo de eletroforese de 20 horas ;

2º estágio: pulsos elétricos de 3 a 20 s. e tempo de eletroforese de 4 horas.

- Programa V

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 8,5 s. e tempo de eletroforese de 16 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 8 a 40 s. e tempo de eletroforese de 4 horas.

- Programa VI

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 8,5 s. e tempo de eletroforese de 8 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 5 a 80 s. e tempo de eletroforese de 10 horas.

- Programa VII

1º estágio: pulsos elétricos de 3 a 60 s. e tempo de eletroforese de 10 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 8,5 s. e tempo de eletroforese de 8 horas.

- Programa VIII

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 8,5 s. e tempo de eletroforese de 14 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 10 a 20 s. e tempo de eletroforese de 4 horas.

- Programa IX

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 13 s. e tempo de eletroforese de 12 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 20 a 80 s. e tempo de eletroforese de 4 horas.

- Programa X

1º estágio: pulsos elétricos de 0,5 a 8,5 s. e tempo de eletroforese de 6 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 20 a 80 s. e tempo de eletroforese de 10 horas

- Programa XI:

1º estágio: pulsos elétricos de 1 a 4 s. e tempo de eletroforese de 8 horas;

2º estágio: pulsos elétricos de 4 a 40 s. e tempo de eletroforese de 10 horas.

4.6.5 PFGE das estirpes de *U. diversum*, *U. urealyticum* e isolados clínicos

Foram realizadas eletroforeses dos produtos obtidos pela digestão do DNA das cepas de *U. diversum* (ATCC 49782, ATCC 49783 e isolado de Touro), *U. urealyticum* (T960) e isolados clínicos de ureaplasma obtidos de material biológico das espécies caprina e ovina. Os produtos digeridos pela *Sa*I foram separados pelo em aparelho para sistema de eletroforese em campo pulsado (CHEF Mapper Dr-III, Bio-Rad®). O peso molecular padrão Lambda Ladder (50 a 1000 Kpb, BioLabs®) foi utilizado em todas as eletroforeses. O gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,1 µg/mL) por 60 minutos e visualizado sob luz ultravioleta (UV).

4.6.6 Análise da PFGE

Os fragmentos polimórficos foram analisados pelo programa BioNumeric®. O dendrograma foi produzido de acordo com o “Weight Pair-Group Mean Arithmetic Method” (UPGMA), baseado no coeficiente DICE com 1% de otimização.

4.7 SEQUÊNCIAMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS

O volume de 2mL de cultura dos isolados clínicos (origem: 11 ovinos e um caprino) e das cepas de referência foram utilizados na extração do DNA pelo método descrito por Boom et al. (1990), com modificações (Anexo C).

4.7.1 Otimização da PCR com “primers” F16S e R16 e seqüenciamento do gene 16S rRNA

A seqüência do gene 16S rRNA foi amplificada pela PCR por meio dos

“primers” universais F16S e R16S (Quadro 4), descrito por Harasawa e Cassel (1996).

“Primers”	Seqüência	Produto
F16S	5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA GG-3'	~1400
R16S	5'- GGG ATA CCT TGT TAC GAC TT-3'	

Quadro 4 - “Primers” F16S/R16S utilizados na reação de PCR para seqüenciamento do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos e o tamanho do produto amplificado

Para a reação em cadeia da polimerase, foram adicionados a um microtubo (0,2mL) 10pmol de cada “primer”, 0,5U de *Taq* DNA polimerase High Fidelity (Platinum-Invitrogen®), 1,5mM de MgCl₂, 200mM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 5μl da amostra de DNA e água ultrapura até volume final de 50μl. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94°C por 5 min., 30 ciclos de 95°C por 30 s., 58°C por 30 s., 72°C por 1 min., um ciclo final de 72°C por 5 min. e 4°C por 10 min.

Os produtos da PCR (10μl) e o marcador 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 10μg/mL de brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM Tris-acetato; 2mM EDTA, pH 8,0). A visualização dos produtos foi realizada sob luz UV. Estes produtos foram analisados em eletroforese em gel de agarose para verificar a presença de apenas um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Em seguida, foram purificados utilizando o GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham®) e quantificados em gel de agarose 2% utilizando o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®) contendo 10μg/mL de brometo de etídeo. A visualização dos produtos foi realizada sob luz UV.

As amostras amplificadas foram enviadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano – USP, Setor de Seqüenciamento de DNA. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090. As seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

4.7.2 Sequenciamento com novos “primers” RCO3 e RCO4

Foram utilizados os seqüenciamentos dos isolados clínicos (identificados como ureaplasma e micoplasma) e das cepas de referência de ureaplasma, obtidos pelos “primers” F16S/R16S, no desenvolvimento dos novos “primers” RCO3 e RCO4 (Quadro. 5), referentes à região interna do gene 16S rRNA. As seqüências foram analisadas utilizando-se o programa CLC FREE WORKBENCH 5. para alinhamento e verificação de regiões-alvo. Foram escolhidas duas seqüências conservadas para espécies de micoplasma e ureaplasma, entre os isolados e as cepas de referência seqüenciadas, submetidas ao programa GENE RUNNER para análise e sua posterior síntese.

“Primers”	Seqüência	Produto	Localização
RCO3	5'- GGA GGC AGC AGT AGG GAA T - 3'	~700 pb	335 – 354
RCO4	5'- CCA ACA TCT CAC GAC ACG A - 3'		1052 –1071

Quadro 5 - “Primers” RCO3/RCO4 utilizados na reação da PCR para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos, tamanho do produto amplificado e localizações

4.7.2.1 Padronização da PCR com “primers” RCO3 e RCO4

Para a reação em cadeia da polimerase, foram adicionados a um microtubo (0,2mL) 10pmol de cada “primer”, 0,5U de *Taq* DNA polimerase High Fidelity (Platinum -Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂, 200mM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 5µl da amostra de DNA e água ultrapura até volume final de 50µl. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94°C por 5 min., 30 ciclos de 95°C por 30 s., 60°C por 30 s., 72°C por 1 min., um ciclo final de 72°C por 5 min. e 4°C por 10 min. O produto foi visualizado, purificado e seqüenciado como descrito nos itens 4.7.1.

4.7.3 Sequenciamento com novos “primers” RCO5 e RCO6

Foram utilizados os seqüenciamentos obtidos pelos “primers” F16S/R16S e RCO3/RCO4 para o desenho dos “primers” RCO5 e RCO6 da região interna do gene 16S rRNA. As seqüências foram analisadas, utilizando-se o programa CLC FREE WORKBENCH 4 para alinhamento e verificação de regiões-alvo.

Foram escolhidas duas seqüências conservadas, entre as amostras seqüenciadas, e submetidas ao programa GENE RUNNER, para análise e sua posterior síntese. Os “primers” RCO6/R16S e RCO5/F16S foram utilizados para confirmação das seqüências iniciais e finais obtidas com os “primers” F16S/R16S do gene 16S rRNA.

“Primers”	Seqüência	Produto
F16S RCO5	5'- GAG TTT GAT CCT GGC TCA GG - 3' 5'- CGT AGG AGT ATG GGC CGT GT - 3'	~350 pb
RCO6 R16S	5'- CGT GCT ACA ATG GCT AAT A - 3' 5'- GGG ATA CCT TGT TAC GAC TT - 3'	~290 pb

Quadro 6 - “Primers” F16S/RCO5 e RCO6/R16S utilizados na reação da PCR para seqüenciamento da região interna do gene 16S rRNA com as seqüências de nucleotídeos e tamanho dos produtos amplificados

Para a reação em cadeia da polimerase, foram adicionados a um microtubo (0,2mL) 10pmol de cada “primer”, 0,5U de *Taq* DNA polimerase High Fidelity (Platinum-Invitrogen®), 1,5mM de MgCl₂, 200mM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 5µl da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50µl. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94°C por 5 min., 30 ciclos de 95°C por 30 s., 58°C por 30 s., 72°C por 1 min., um ciclo final de 72°C por 5 min. e 4°C por 10 min.

4.7.4 Análise do sequenciamento do gene 16S rRNA

Os seqüenciamentos, realizados com os “primers” F16S/R16S, RCO3/RCO4, F16S/RCO5 e R16S/RCO6 foram analisados pelo programa CLC FREE WORKBENCH 5. para a formação da fita única de nucleotídeos do gene 16S rRNA dos isolados clínicos e das cepas de referência. As seqüências primárias dos nucleotídeos dos isolados clínicos, *U. diversum* (ATCC 49782 e 49783), *U. urealyticum* (T960) e cepas depositas no GenBank (Tab. 1) foram submetidas ao Progama Bionumeric para análise e formação do dendograma, de acordo com o “Weight Pair-Group Mean Arithmetic Method” (UPGMA).

Tabela 1 - Espécies de micoplasma e ureaplasma e o número de identificação no GenBank escolhidas para alinhamento do gene 16S rRNA na formação do dendograma.

Espécie	Nº no GenBank
<i>Mycoplasma ovine/caprine</i> sorogrupo 11	AY121094
<i>Ureaplasma canigenitalium</i>	D78648
<i>Ureaplasma cati</i>	D78949
<i>Ureaplasma gallorale</i>	U622937
<i>Ureaplasma diversum</i>	D78650
<i>Ureaplasma felinum</i>	D78651
<i>Ureaplasma gallorale</i>	U62937
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	L40490
<i>Ureaplasma</i> sorovar 5	U06097
<i>Ureaplasma</i> sorovar 7	U06094

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO

Todos os isolados clínicos de caprinos e ovinos foram obtidos de animais apresentando alguma sintomatologia no sistema reprodutivo.

Das amostras de suabes de muco vulvovaginal de ovinos, obteve-se 25 (20,83%) isolados (Figura 3), sendo 17 (68%) identificados como *Ureaplasma* spp., um (4%) como micoplasma e sete (28%) com crescimento misto (*Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp - Figura 4) em meio UB. Das 11 amostras de sêmen ovino foram obtidos três (27%) isolados de *Ureaplasma* spp. provenientes de animais apresentando sinais clínicos de orquite, balanopostite e baixa motilidade dos espermatozoides.

Das amostras de suabe de muco vulvovaginal de caprinos, obtiveram-se cinco (5%) isolados, sendo quatro (80%) identificados como *Ureaplasma* spp. e um (20%) como *Mycoplasma* spp. Das 23 amostras de sêmen caprino não foram obtidos isolamentos.

Figura 3 - Colônias de *Mycoplasma* spp. (com núcleo e sem núcleo) isoladas de material biológico da espécie ovina (100x;microscópio).

Figura 4 - Colônias de *Ureaplasma* spp (A) e Mista (*Ureaplasma* spp e *Mycoplasma* spp :B) isoladas de material biológico da espécie ovina (A: 40x; B:100x; microscópio estereoscópico).

5.2 PCR PARA DETECÇÃO DA CLASSE *Mollicutes*

Das amostras de ovinos - 120 de muco vulvovaginal e 11 sêmens - foram obtidas resultados positivos em 88 (73,33%) e oito (72,72%), respectivamente, para classe *Mollicutes*. Das 98 mostras clínicas de fêmeas e dos 23 de sêmen da espécie caprinas, 75 (76,53%) e 17 (73,91%) foram positivas, respectivamente, para esta classe de microrganismos (Figura 5).

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR (subunidade 16S rRNA) utilizando “primers” genéricos GPO3/MGSO, a partir do DNA extraído de amostras clínicas de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna 1 a 10: amostras de muco vulvovaginal sendo positivas as colunas 2, 4, 5, 7 e 9. Coluna 11: controle negativo das reações com água ultra-pura. Coluna 12: controle positivo da reação com DNA de *Mycoplasma bovis*. Coluna 13: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

5.3 PCR PARA DETECÇÃO DE *Acholeplasma laidlawii*

As amostras clínicas de ovinos e caprinos positivas na PCR Classe *Mollicutes*, foram submetidas à PCR para a detecção de *Acholeplasma laidlawii*. Das 120 amostras de suabes de muco vulvovaginal de ovinos, 80 foram submetidas à PCR obtendo-se três (3,75%) positivas (Figura 6). Das 75 amostras de suabes de muco vulvovaginal de caprinos e dos semens de caprino/ovino foram negativas.

Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR (subunidade 16S rRNA) espécie *Acholeplasma laidlawii*, utilizando “primers” UNI /ACHA3, a partir do DNA extraído de amostras clínicas de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna 1: controle positivo da reação com DNA de *A. laidlawii*. Colunas 2 a 6 amostras mucovulvovaginal sendo positivas as colunas 2 e 3. Coluna 7: controle negativo das reações com água ultra-pura. Coluna 8: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

5.4 PCR PARA DETECÇÃO DE *Mycoplasma arginini*

Das amostras clínicas de muco vulvovaginal e sêmen das espécies caprina/ovina foi obtida uma amostra positiva de sêmen para a espécie ovina, sendo as demais amostras negativas (Figura 7).

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR (subunidade 16S rRNA) espécie *Mycoplasma arginini*, com “primers” MAGF/GP4R, a partir do DNA extraído de amostras clínicas de muco vulvovaginal de ovelhas. Coluna 01 a 08: amostras muco vulvovaginal negativas; Coluna 09: controle positivo da reação com DNA de *M. arginini*. Colunas 10: controle negativo das reações com água ultra-pura. Coluna 11: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

5.5 OTIMIZAÇÃO DA PFGE

Para a definição dos parâmetros da PFGE foram testados: tempo de centrifugação para sedimentação e tampão de lavagem das células de ureaplasma, digestão enzimática, tampão de eletroforese, tampão para lavagem dos blocos e programa de separação dos fragmentos digeridos.

5.5.1 Tempo de centrifugação e tampão de lavagem

O protocolo descrito por Buzinhani (2006) foi alterado modificando-se o tempo de rotação de 50 para 75 min. na sedimentação de 120mL de cultura de ureaplasma. O sedimento foi ressuspensionado em 2mL de PBS (pH 7,20) e centrifugado a 20600 xg/40 min.

5.5.2 Digestão enzimática

Utilizando a metodologia e os padrões de corrida eletroforética descrito por Buzinhani (2006), com a adição de BSA (1mg/mL) no processo de digestão enzimática com a *Sa*II, foram observados fragmentos mais nítidos (Figura 8).

Figura 8 - PFGE (Programa I, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%) do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, referente à quantidade de BSA, utilizada na digestão enzimática com a enzima *Sa*II. Coluna 1 a 4: amostras de referência digeridas com BSA 1,5μL (100mg/mL); Coluna 5 a 7: amostras de referência digeridas com BSA com 0,5μL (100mg/mL), Coluna 8 a 11: amostras de referência digeridas sem BSA. PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

5.5.3 Concentração de Thiourea

Mantidos a metodologia e os parâmetros descritos no item 5.5.2, foram digeridos um bloco de cada cepa de referência de *U. diversum* (49783 ATCC e *U. 49782* ATCC) e *U. urealyticum* (T960) na concentração de 1mg/mL de BSA. Metade de cada bloco foi utilizado na corrida eletroforética (Programa I) sem Thiourea (Figura 8) e com Thiourea, no gel e no tampão de corrida, a 150ng/mL. Observou-se melhor resultado na utilização da Thiourea (Figura 9).

Figura 9 - PFGE (Programa I, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sa*I e BSA (1,5mg/mL), referente à padronização da corrida eletroforética sem Thiourea. Coluna 1 a 3: amostras de referência. PL: padrão Lambda Ladder (48.5 a 1018.5 Kpb)

Figura 10 - PFGE (Programa I, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sa*I e BSA (1,5mg/mL), referente à padronização da corrida eletroforética com Thiourea, no gel e tampão de corrida, a 150ng/mL. Coluna 1 a 3: amostras de referência. PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

5.5.4 Tampão de lavagem

As cepas de referência testadas não apresentavam fragmentos nítidos.

Cultivos de 120mL de *U. diversum* e *U. urealyticum* foram realizados para repetição do experimento com alteração no tampão de lavagem e programa de corrida. Os parâmetros, digestão enzimática com *Sall* e BSA (1mg/mL), presença de Thiourea (150mg/mL) no gel de agarose (1,2%) e no tampão de corrida foram mantidos.

Após a lavagem dos blocos com Tampão A, B e C (item 4.6.2) e digestão enzimática foi realizada uma corrida eletroforética com o Programa IV para visualização das diferenças obtidas no uso de cada tampão. O Tampão C apresentou melhores resultados para fragmentos abaixo de 97,0 Kpb visualizados na figura (Figura 11).

Figura 11 - PFGE (Programa IV, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%) do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sall* e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Colunas 1 a 3: *U. urealyticum* (T960). Coluna 4 a 6: *U. diversum* (ATCC 49783); Coluna 1A e 4A: Tampão A; Coluna 2B e 5B: Tampão B e Coluna 3C e 6C: Tampão C. PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

5.5.5 Padronização dos programas de eletroforese

Diferentes pulsos e tempos na corrida eletroforética foram testados para a escolha do programa que resultasse na visualização de fragmentos nítidos da cepa de referência e do peso molecular para, posteriormente, serem submetidos os isolados clínicos juntamente com as cepas de referência. O Quadro 7 relaciona os programas aos resultados obtidos na corrida eletroforética. Para todos os programas foram fixados voltagem de 6,0V/cm e ângulo de 120°.

Programa	1º estágio		2º estágio	
	Pulsos (segundos)	Eletroforese (horas)	Pulsos (segundos)	Eletroforese (horas)
I (Figura 08)	0,5 a 13,0	18	3,0 a 20,0	02
II (Figura 12)	0,5 a 8,5	16	25,0 a 35,0	02
III (Figura 13)	0,5 a 5,0	18	30,0 a 40,0	06
IV (Figura 11)	0,5 a 13,0	20	3,0 a 20,0	04
V (Figura 14)	0,5 a 8,5	16	8,0 a 40,0	04
VI (Figura 15)	0,5 a 8,5	08	5,0 a 80,0	10
VII (Figura 16)	3,0 a 60,0	10	0,5 a 8,5	08
VIII (Figura 17)	0,5 a 8,5	14	10,0 a 20,0	04
IX (Figura 18)	0,5 a 13,0	12	20,0 a 80,0	04
X (Figura 19)	0,5 a 8,5	06	20,0 a 80,0	10
XI (Figura 20)	1,0 a 4,0	10	4,0 a 40,0	08

Quadro 7. Programas compostos de dois estágios, com pulsos e tempo de corrida, utilizados na PFGE.

Iniciamos a padronização dos pulsos, objetivando maior distanciamento entre os fragmentos acima de 242,5 Kpb, referentes ao peso molecular. Foram utilizadas as cepas de referência *U. diversum* (ATCC 49783) e *U. urealyticum* (T960) e

corridas eletroforéticas com Thiourea no tampão de corrida e no gel de agarose a 1,2% .

Figura 12 - PFGE (Programa II, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sa*II e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1 e 2: *U. diversum* (ATCC 49783); Colunas 3 e 4: *U. urealyticum* (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

O Programa II testado (Figura12) não foi suficiente no distanciamento dos fragmentos do peso molecular, acima de 242,5 Kpb, necessário na quantificação da

cepa de referência de *U. urealyticum* (T960), única espécie de ureaplasma com sequenciamento completo do genoma.

Foram realizadas corridas com os Programas: III (Figura 13); IV (Figura 14); V (Figura 14); VI (Figura 16); VII (Figura 17); VII (Figura 18); IX (Figura 19); X (Figura 20).

Figura 13 - PFGE (Programa III, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sa*I e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1 e 2: *U. urealyticum* (T960); Colunas 3 e 4: *U. diversum* (ATCC 49783). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

Figura 14 - PFGE (Programa V, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sa*I e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: *U. urealyticum* (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

Figura 15 - PFGE (Programa VI, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sa*I e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: *U. diversum* (ATCC 49783); Coluna 2: *U. urealyticum* (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48.5 a 1018.5 Kpb)

Figura 16 - PFGE (Programa VII, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sa*I e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: *U. urealyticum* (T960); Coluna 2: *U. diversum* (ATCC 49783). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

Figura 17 - PFGE (Programa VIII, gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepas de referência de ureaplasma, digestão enzimática com *Sa*II e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1 a 3: *U. urealyticum* (T960); Coluna 4 a 6: *U. diversum* (ATCC 49783). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

Figura 18 - PFGE (Programa IX gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepa de referência de ureaplasma e isolado clínico, digestão enzimática com *SaII* e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: isolado clínico de sêmen de ovino; Coluna 2: *U. urealyticum* (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb).

Figura 19 - PFGE (Programa X gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepa de referência de ureaplasma e isolado clínico, digestão enzimática com *Sall* e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Coluna 1: isolado clínico de sêmen de ovino; Coluna 2: *U. urealyticum* (T960). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

5.5.6 PFGE para isolados clínicos e cepas de referência

Foram fixados os parâmetros para a realização da PFGE: 120mL de cultura com sedimentação em centrifugação 16280 x *g*/75min; lavagem do sedimento de

ureaplasma PBS (pH 7,20) em centrifugação a 20600 x g/40 min.; digestão protéica de 20 horas (proteinase K: 1mg/mL); Tampão C na lavagem dos blocos, digestão enzimática com *Sal* I (20U) e BSA (1mg/mL); adição de Thiourea (150mg/mL) no gel de agarose (1,2%) e tampão de corrida e Programa XI.

Os 24 isolados clínicos de ureaplasma e cepas de referência foram submetidos à PFGE (Figura 20) e somente 12 (50%) de origem ovina, apresentaram fragmentos, sendo 10 de muco vulvovaginal e dois de sêmen, provenientes de seis propriedades (Figura 21).

Figura 20 - PFGE (Programa XI gel de agarose a 1,2% e TBE a 0,5%), do DNA extraído de culturas de cepa de referência de ureaplasma e isolado clínico, digestão enzimática com enzima *Sal* I e BSA (1,5mg/mL), corrida eletroforética com Thiourea (150ng/mL) no gel e tampão de corrida. Colunas 1: *U. urealyticum* (T960). Coluna 2: *U. diversum* (ATCC 49783); Coluna 3: *U. diversum* (ATCC 49782); Coluna 4: isolado de sêmen de Touro; Coluna 5: isolado de sêmen de ovino (1004); Coluna 6: isolado de sêmen de ovino (3012); Coluna 7: isolado de mucovulvovaginal de ovino (s/n enoc). PL: padrão Lambda Ladder (48,5 a 1018,5 Kpb)

5.5.7 Análise da PFGE dos produtos obtidos pela digestão da enzima *SaI* com isolados clínicos e cepas de referência de ureaplasma

O dendograma obtido pelo coeficiente DICE (otimização 1%), a partir do perfil enzimático da *SaI* utilizando ponto de corte $\geq 70\%$ para similaridade, (STRUELENS et. al, 2001) permitiu agrupar os isolados clínicos em seis “clusters” que variaram a similaridade de 74 a 100% (Figura 21). O isolado de ureaplasma obtido de Touro e o *Ureaplasma diversum* ATCC 49782 ficaram em “clusters” diferentes mais agrupados aos isolados de ureaplasma obtidos da espécie ovina. As cepas de referência *Ureaplasma diversum* ATCC 49782 e ATCC 49783 foram isoladas de distúrbios reprodutivos de macho e fêmea da espécie bovina, respectivamente. Todos os isolados clínicos de ureaplasma da espécie ovina, o de Touro e a cepa de referência ATCC 49782 ficaram separados da ATCC 49783.

Figura 21 - Dendograma obtido, pelo UPGMA por análise de agrupamento (coeficiente de DICE, otimização 1%), dos fragmentos de DNA de isolados clínicos de ureaplasma da espécie ovina com distúrbios reprodutivos, isolado de bovino e cepas de referência (ATCC 49782, ATCC 49783 e T960), digeridas pela enzima *SaI*. F: fêmea, M: macho, P: propriedade. Seta: ponto de corte “Cluster”: 1,2,3,4,5,e 6

5.6 SEQUENCIAMENTO

Foram utilizados cinco isolados clínicos de ureaplasma (caprino/ovino) para início da otimização dos “primers” F16S/R16S, destinados ao seqüenciamento do gene 16S rRNA. A cepa de referência *U. diversum* (ATCC 49783) foi utilizada como controle. Na eletroforese dos produtos amplificados pela PCR, com os “primers” F16S/R16S, visualizou-se reações inespecíficas (Figura 22). Foi realizado o gradiente de temperatura e escolhida a de 58°C (Figura 23).

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando “primers” universais F16S/R16S, a partir do DNA extraído de culturas de isolados clínicos de muco vulvovaginal das espécies caprina e ovina e sêmen de ovinos. Coluna 01: peso molecular; Coluna 2: 4 cap F P9; Coluna 3: 49 ov F P2; Coluna 4: controle negativo; Coluna 5: 330 ov F P1; Coluna 6: 1004 ov M P1; Coluna 7: 3012 ovi M P1; Coluna 8: *Ureaplasma diversum* ATCC 49783

Figura 23 - Eletroforese, em gel de agarose, da PCR, dos produtos amplificados utilizando “primers” universal F16S/R16S, a partir do DNA extraído de cultura de isolado clínico de muco vulvovaginal das espécies caprina. Coluna 01: peso molecular; Coluna 2 a 9: 4capFP9. Coluna 2: 58°C; Coluna 3: 58,5°C; Coluna 4: 59,7°C; Coluna 5: 60,5°C; Coluna 6: 61,3°C; Coluna 7: 63°C; Coluna 8: 64°C

5.6.1 PCR com “primers” F16S/R16S

Os DNAs de 12 isolados clínicos e três cepas de referência (Tabela 2) foram submetidos à PCR com “primers” R16S/F16S (Figura 24) e corrida eletroforética (agarose 1,5%), para verificação da presença de apenas um fragmento de aproximadamente 1500pb. Os produtos amplificados foram purificados e quantificados (Figura 25) em gel de agarose 2% utilizando o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen®).

Tabela 2 - Isolados clínicos de ureaplasma, das espécies caprina e ovina, e cepas de referência submetidos à PCR com “primers” R16S/F16S para a amplificação e sequenciamento completo do gene 16S rRNA .

Coluna (Figura 23 e 24)	Isolado	Espécie	Sexo	Propriedade
1	s/n	Ovina	Fêmea	P ₅
2	11	Ovina	Fêmea	P ₅
3	13	Ovina	Fêmea	P ₅
4	45A	Ovina	Fêmea	P ₅
5	45	Ovina	Fêmea	P ₃
6	47	Ovina	Fêmea	P ₂
7	49	Ovina	Fêmea	P ₂
8	128	Ovina	Fêmea	P ₆
9	04	Caprina	Fêmea	P ₄
10	120	Ovina	Fêmea	P ₁
11	1004	Ovina	Macho	P ₁
12	3012	Ovina	Macho	P ₁
13	<i>U. diversum</i> 49782	Bovina	Macho	-
14	<i>U. diversum</i> 49783	Bovina	Fêmea	-
15	<i>U. urealyticum</i> T960	Humana	-	-

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando “primers” universais F16S/R16S, a partir do DNA de culturas de cepas de referência e isolados de material clínico de muco vulvovaginal e sêmen da espécie caprina e ovina. Coluna 1 a 8 e 10: isolado clínico de fêmea ovina; Coluna 9: isolado clínico de fêmea caprina; Coluna 11 e 12: isolado clínico de sêmen ovino; Coluna 13 a 15: cepas de referência; Coluna 16: controle negativo da reação com água ultra-pura Coluna 17: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

Figura 25 - Eletroforese em gel (agarose 2%) dos produtos da PCR utilizando “primers” F16S/R16S a partir do DNA purificado de culturas isoladas de muco vulvovaginal e sêmen das espécies caprina e ovina. Coluna 1: Mass ladder, Coluna 2 a 16: isolados clínicos e cepas de referência.

5.6.2 Análise dos seqüenciamentos obtidos pelos “primers” F16S/R16S

O sequenciamento dos isolados clínicos e cepas de referência foram alinhados (Programa CLC FREE WORKBENCH 4.) e analisados. O produto de 1500pb obtidos da amplificação com os “primers” universais, quando seqüenciado, não apresentou leitura de aproximadamente 600 bases referente à região interna do gene 16S rRNA. Regiões conservadas, entre os gêneros ureaplasma e micoplasma, foram escolhidas e submetidas ao programa GENE RUNNER para análise e posterior síntese dos novos “primers” RCO3/RCO4. Os alinhamentos e análise do produto amplificado pelos “primers” F16S (Figura 26) e R16S (Figura 27) foram feitos separadamente.

Figura 26 - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos dos isolados clínicos ovino/caprino e cepas de referência obtidas pelo sequenciamento com o “primer” F16S. Em destaque: regiões homólogas para micoplasma e ureaplasma escolhida para o “primer” RCO3

Figura 27 - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos dos isolados clínicos ovino/caprino e cepas de referência obtidas pelo sequenciamento com o “primer” R16S. Em destaque: regiões homólogas para micoplasma e ureaplasma escolhida para o “primer” RCO4

5.6.3 Localização dos novos “primers” RCO3 e RCO4 no gene 16S rRNA

Foi utilizado o sequenciamento do *Ureaplasma urealyticum* (genoma completo sequenciado), para demonstrar a localização escolhida (Figura 28a, b) também conservada nos isolados clínicos, cepas de referência e *Mycoplasma* spp.

Figura 28a - Representação esquemática utilizada no desenho dos “primers” RCO3/RCO4 para o sequenciamento da região interna ao gene 16S rRNA dos isolados clínicos e cepas de referência

```
GAGTTTGATCCTGGCTCAGGATTAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAATCGAACGAAGCCTTTTAGGCTT
AGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCTTAAGTTGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATA
CCGAATAATAACATCAATATCGCATGAGAAGATGTAGAAAAGTCGCTCTTTGTGGCGACGCTTTTGGATGAGGGTG
CGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGTCAATGACGCGTAGCTGTACTGAGAGGTAGAACAGC
CACAATGGGACTGAGACACGGCCCATCTCCTACGGAGGAGCAGTAGGGAATTTTTCACAATGGGCGCAAGCC
TTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTATAGATTGTAAAGTTCTTTTATATGGGAAGAAACGCTAAG
ATAGGAAATGATTTTAGTTTGAATTAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAACGAGCGCAGGCGGGTTTGTAAAGTTTGGTATTAAAT
CTAGATGCTTAACGTCTAGCTGTATCAAAAACGTGTAACCTAGAGTGTAGTAGGGAGTTGGGGAACCTCCATGTGG
AGCGGTAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGCCAACTTGGACTATCACTGACGCTTAGG
CTCGAAAGTGTGGGGAGCAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAATGTTCGG
CCCGAATGGGTGCGTGTGTAGCTAACGCATTAAATGATGTGCCTGGGTAGTACATTCGCAAGAATGAAACTCAA
ACGGAATTGACGGGGACCGCACAAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCTTACCTAG
GTTTGACATCTATTGCGATGCTATAGAAATATAGTTGAGGTTAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGTTAGTTACTTTTCTAGCGATACT
GCTACCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAACGTGCT
ACAATGGCTAATACAACTGCTGCAAAATCGTAAAGTGAAGCGAAACAGAAAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGA
GGGCTGCAATTTCGTCTCTTGAAGTTGGAATCACTAGTAATCGCGAATCAGACATGTCGCGGTGAATACGTTCTC
GGGTCTGTACACACCGCCCGTCAAACCTATGGGAGCTGGAATATCTAAAACCGGCAAAGCTAACCTTTTGAGG
CATGCGTCTAGGGTAGGATCGGTGACTGGAGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCC
```

Figura 28b - Localização dos “primers” F16S e R16S (preto) e RCO3 posição 335pb 5’→3’ e RCO4 posição 407pb 3’→5’ (cinza) na sequência completa do gene 16S rRNA do *Ureaplasma urealyticum* (GenBank nº AY 121094)

5.6.4 PCR com “primers” RCO3/RCO4

Os isolados clínicos e cepas de referência (Tabela 2) foram amplificados pelos “primers” RCO3/RCO4 e realizada a eletroforese (Figura 29) para verificação da presença de apenas um fragmento de aproximadamente 700pb. Os produtos amplificados foram purificados, quantificados e seqüenciados.

Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados pela PCR utilizando “primers” RCO3/RCO4, a partir do DNA de culturas de cepas de referência e isolados de material clínico de muco vulvovaginal e sêmen da espécie caprina e ovina. Coluna 1 a 4: isolados clínicos Coluna 5 a 7: cepas de referência. Coluna 8: controle negativo da reação com água ultra-pura Coluna 9: padrão de peso molecular de DNA – 100 bp

5.6.5 Confirmação do seqüenciamento na seqüência interna do gene 16S rRNA

Para confirmação do seqüenciamento foram desenhados mais dois “primers” RCO5 e o RCO6 (Figura 30), devido às perdas no início e final do seqüenciamento de todos os isolados clínicos e as cepas quando utilizado os “primers” universais.

Foi realizada a PCR com os “primers” F16S/RCO5 e RCO6/R16S dos isolados e cepas de referência e sequenciamento.

Figura 30 - Representação esquemática utilizada no desenho dos “primers” RCO5/RCO6 para o término do sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados clínicos e cepas de referência

5.6.6 Alinhamento das regiões amplificadas

O sequenciamento realizado com os “primers” F16S, R16S, RCO3, RCO4, RCO5 e RCO6 foram alinhados (Programa CLC FREE WORKBENCH 4). para a formação de uma única fita do gene 16S rRNA dos isolados clínicos juntamente com cepas de referência (Figura 31) e com as cepas depositadas no GenBank (Figura 32 e 33)

		20		40		60		80		
47 av F P4	ATTACGCTGG	CGGCATGCTA	ATACATGCAA	TGAAACGAAG	CCTTTTGGC	TTAGTGGTGA	ACGGGTGAGT	AACACGTATC	CAATCTACCC	90
3012 av M P1	C									90
4 cap F P4	C									90
1004 av F P1	.A.									90
45 av F P3										90
U diversum 49783										90
U diversum 49782										90
49 av M P4										90
S/N av F P5	C				A				G	90
45A av F P5					A				G	90
128 av F P6	C				A				G	90
11 av F P5	C				A				G	90
U uralitycum T960					A				C	90
	100	120	140	160	180	200	220	240	260	
47 av F P4	TTAAGTTTGG	GATAACTAGT	CGAAAGATTA	GCTAATACCG	GATAATAACA	TTTGCTTGCA	TGAGTGAATG	TAGAAAGTTG	CGTTTGCAAC	180
3012 av M P1										180
4 cap F P4										180
1004 av F P1										180
45 av F P3										180
U diversum 49783	A				A	G	CTT	AA		180
U diversum 49782							A			180
49 av M P4										180
S/N av F P5		G	C	A	A	ACGTT	C	ATGT		180
45A av F P5		G	C	A	A	ACGTT	C	ATGT		180
128 av F P6		G	C	A	A	ACGTT	C	ATGT		180
11 av F P5		G	C	A	A	ACGTT	C	ATGT		180
U uralitycum T960	G				A	CATA	C	AAG	C	180
	280	300	320	340	360	380	400	420	440	
47 av F P4	GCTTTTGGAT	GAGGGTGCGA	CGTATCAGAT	AGTTGGTGAG	GTAACGGCTC	ACCAAGTCAT	TGACGCGTAG	CTGTACTGAG	AGGTAGAACA	270
3012 av M P1										270
4 cap F P4										270
1004 av F P1										270
45 av F P3										270
U diversum 49783										270
U diversum 49782										270
49 av M P4										270
S/N av F P5							GA			270
45A av F P5							GA			270
128 av F P6							GA			270
11 av F P5							GA			270
U uralitycum T960	G				T		A			270
	280	300	320	340	360	380	400	420	440	
47 av F P4	GCCACAATGG	GACTGAGACA	CGGCCCATAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTA	GGGAATTTT	CACAATGGGC	GAAAGCCTTA	TGAAGCAATG	360
3012 av M P1										360
4 cap F P4										360
1004 av F P1										360
45 av F P3										360
U diversum 49783										360
U diversum 49782										360
49 av M P4										360
S/N av F P5								C		360
45A av F P5								C		360
128 av F P6								C		360
11 av F P5								C		360
U uralitycum T960										360
	380	400	420	440	460	480	500	520	540	
47 av F P4	CCGCGTGAAC	GATGAAGGTC	TATAAGATTG	TAAAGTTCTT	TTATTTGGGA	AGAACCACTA	AAATAGGAAA	TGATTTTAGT	TTGACTGTAC	450
3012 av M P1										450
4 cap F P4										450
1004 av F P1										450
45 av F P3										450
U diversum 49783										450
U diversum 49782										450
49 av M P4										450
S/N av F P5	C	C				TGT	G	C		450
45A av F P5	C	C				TGT	G	C		450
128 av F P6	C	C				TGT	G	C		450
11 av F P5	C	C				TGT	G	C		450
U uralitycum T960		TAT			A	A	G	G		450

	1.000	1.020	1.040	1.060	1.080					
47 ov F P4	TAACAATATG	ACAGGTGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT	GTTGGGTAA	GTCCCGCAAC	GAGCGCAACC	CCTTTCGCTA	1080
3012 ov M P1										1080
4 cap F P4										1080
1004 ov F P1										1080
45 ov F P3										1080
U diversum 49783	..*	..*	..*							1077
U diversum 49782										1080
49 ov M P4										1080
S/N ov F P5										1080
45A ov F P5										1080
128 ov F P6		*								1079
11 ov F P5										1080
U urealitycum T960		..T.							..T.	1077
	1.100	1.120	1.140	1.160						
47 ov F P4	GTAAATTTAT	CTATCGATAC	TGCTACCGCA	AGGTAGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAAT	CATCATGCCC	CTTATATCTA	GGGCTGCAAA	1170
3012 ov M P1										1170
4 cap F P4										1170
1004 ov F P1										1170
45 ov F P3										1170
U diversum 49783										1167
U diversum 49782										1170
49 ov M P4										1170
S/N ov F P5										1170
45A ov F P5										1170
128 ov F P6										1169
11 ov F P5										1170
U urealitycum T960	..GC..*	..G.								1166
	1.180	1.200	1.220	1.240	1.260					
47 ov F P4	CGTGCTACAA	TGGCTAATAC	AAACAGCTGC	AAAACCGTAA	GGTGGAGCGA	ATCTGATAAA	GTTAGTCTCA	GTTCCGATAG	AGGGCTGCAA	1260
3012 ov M P1										1260
4 cap F P4										1260
1004 ov F P1										1260
45 ov F P3										1260
U diversum 49783			..TT..C.	..T.						1257
U diversum 49782			..TT..C.	..T.						1260
49 ov M P4										1260
S/N ov F P5				..CA.				..T.		1260
45A ov F P5				..CA.				..T.		1260
128 ov F P6				..CA.				..T.		1259
11 ov F P5				..CA.				..T.		1260
U urealitycum T960		..T.	..T.	..A..A.	..A..A.					1256
	1.280	1.300	1.320	1.340						
47 ov F P4	TTCGCCCTCT	TGAAGTTGGA	ATCACTAGTA	ATCGCGAATC	AGACATGTCC	CGGTGAATAC	GTTCTCGGGT	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA	1350
3012 ov M P1										1350
4 cap F P4										1350
1004 ov F P1										1350
45 ov F P3										1350
U diversum 49783										1347
U diversum 49782										1350
49 ov M P4					T					1350
S/N ov F P5		..A.								1350
45A ov F P5		..A.								1350
128 ov F P6		..A.								1349
11 ov F P5		..A.								1350
U urealitycum T960										1346
	1.360	1.380	1.400							
47 ov F P4	AACTATGGGA	GCCGGTAATA	TCTGAAACCG	TACTGTAAAC	CTTTTGGAGC	ATACGTCTAG	GTAGATT			1417
3012 ov M P1										1416
4 cap F P4										1417
1004 ov F P1										1416
45 ov F P3										1417
U diversum 49783				..A.C.	T					1414
U diversum 49782				..A.C.	T					1417
49 ov M P4		..T.	..G.		..A.C.	T				1417
S/N ov F P5					..A.C.					1417
45A ov F P5					..A.C.					1417
128 ov F P6					..A.C.					1416
11 ov F P5					..A.C.					1417
U urealitycum T960		..T.	..A.	..C.AA.C.		..T.G.		..C		1413

Figura 31 - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos dos produtos obtidos pelos “primers” R16S, F16S, RCO3, RCO4, RCO5 e RCO6, do gene 16S rRNA de ureaplasma e micoplasma isolados de muco vulvovaginal e sêmen das espécies caprina/ovina com problemas reprodutivos e cepas de referência. ov: ovino; cap: caprino; F: fêmea; M: macho; P: propriedade

M bovigenitalium	AACGCTGGCT	GTGTGCCTAA	TACATGCATG	TCGAGCGAAG	TGATTTATCA	CTTAGCGGCG	AATGGGTGAG	TAACACGTA
M spp serogrupo 11	AACGCTGGCT	GTGTGCCTAA	TACATGCATG	TCGAGCGAAG	TGATTTATCA	CTTAGCGGCG	AATGGGTGAG	TAACACGTA
120 ov F P1	AAC T TgGcT	GTGTGcCTAa	TACATGCATG	TCGAGCGAAG	TGATTTATCA	CTTA g CGGCG	AATGGGTGAG	TAACACGTA
M bovigenitalium	CTTCAGTTTG	GCATAGCGGT	TGGAACAAC	CGATAATTCC	-AAATACTCG	TAGATGCCGC	ATGGCATTTA	CGGAAAAAGA
M spp serogrupo 11	CTTCAGTTTG	GCATAGCGGT	TGGAACAAC	CGATAATTCC	-AAATACTCG	TAGATGCCGC	ATGGCATTTA	CGGAAAAAGA
120 ov F P1	CTTCAGTTTG	GCATAGCGGT	TGGAACAAC	CGATAATTCC	g AAATACTCG	TAGATGCCGC	ATGGCATTTA	CGGAAAAAGA
M bovigenitalium	GTCGCTGGAG	GAGCGGGGTG	CGCAACATTA	GCTAGTTGGT	GAGGTAACGG	CCCACCAAGG	CGATGATGTT	TAGCGGGGT
M spp serogrupo 11	GTCGCTGGAG	GAGCGGGGTG	CGCAACATTA	GCTAGTTGGT	GAGGTAACGG	CCCACCAAGG	CGATGATGTT	TAGCGGGGT
120 ov F P1	GTCGCTGGAG	GAGCGGGGTG	CGCAACATTA	GCTAGTTGGT	GAGGTAACGG	CCCACCAAGG	CGATGATGTT	TAGCGGGGT
M bovigenitalium	TCCGCCACAC	TGGGACTGAG	ATACGGCCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTAGGGAATA	TTCCACAATG	GACGAAAGT
M spp serogrupo 11	TCCGCCACAC	TGGGACTGAG	ATACGGCCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTAGGGAATA	TTCCACAATG	GACGAAAGT
120 ov F P1	TCCGCCACAC	TGGGACTGAG	ATACGGCCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTAGGGAATA	TTCCACAATG	GACGAAAGT
M bovigenitalium	ACACAGCGTG	CAGGATGAAG	GCCCTATGGG	TTGTAAACTG	CTGTGGTA - A	GGGAATAAAA	AATAGTGTAG	GAAATGCCA
M spp serogrupo 11	ACACAGCGTG	CAGGATGAAG	GCCCTATGGG	TTGTAAACTG	CTGTGGTA - A	GGGAATAAAA	AATAGTGTAG	GAAATGCCA
120 ov F P1	ACACAGCGTG	CAGGATGAAG	GCCCTATGGG	TTGTAAACTG	CTGTGGTA A	GGGAATAAAA	AATAGTGTAG	GAAATGCCA
M bovigenitalium	TGTACCTTAT	TA - GAAAGCA	ACGGCTAACT	ATGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACATAGGT	TGCAAGCGTT	ATCCGGAAT
M spp serogrupo 11	TGTACCTTAT	TA - GAAAGCA	ACGGCTAACT	ATGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACATAGGT	TGCAAGCGTT	ATCCGGAAT
120 ov F P1	TGTACCTTAT	T A - GAAAGCA	ACGGCTAACT	ATGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACATAGGT	TGCAAGCGTT	ATCCGGAAT
M bovigenitalium	AAGCGTCTGT	AGGTTGTTTT	TTAAGTCTGG	CGTTAAATTT	TGGGGCTCAA	CCCCAAACCG	CGTTGGATAC	TGGCAGACT
M spp serogrupo 11	AAGCGTCTGT	AGGTTGTTTT	TTAAGTCTGG	CGTTAAATTT	TGGGGCTCAA	CCCCAAACCG	CGTTGGATAC	TGGCAGACT
120 ov F P1	AAGCGTCTGT	AGGTTGTTTT	TTAAGTCTGG	CGTTAAATTT	TGGGGCTCAA	CCCCAAACCG	CGTTGGATAC	TGGCAGACT
M bovigenitalium	GAGGTTAGCG	GAATTCCTTG	TGAAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATAAGGAA	GAACACCAAC	ATGGCGAAGG	CAGCTAACT
M spp serogrupo 11	GAGGTTAGCG	GAATTCCTTG	TGAAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATAAGGAA	GAACACCAAC	ATGGCGAAGG	CAGCTAACT
120 ov F P1	GAGGTTAGCG	GAATTCCTTG	TGAAGCGGTG	AAATGCGTAG	ATATAAGGAA	GAACACCAAC	T GGCGAAGG	CAGCTAACT
M bovigenitalium	GACACTGAGA	GACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGTTG	ATCATTAGC
M spp serogrupo 11	GACACTGAGA	GACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	T AAACGTTG	ATCATTAGC
120 ov F P1	GACACTGAGA	GACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	AGTCCACGCC	CTAAACGTTG	ATCATTAGC
M bovigenitalium	TCATCGGCGC	AGCTAACGCA	TTAAATGATC	CGCCTGAGTA	GTACGTTTCG	AAGAATAAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGGG
M spp serogrupo 11	TCATCGGCGC	AGCTAACGCA	TTAAATGATC	CGCCTGAGTA	GTACGTTTCG	AAGAATAAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGGG
120 ov F P1	TCATCGGCGC	AGCTAACGCA	TTAAATGATC	CGCCTGAGTA	GTACGTTTCG	AAGAATAAAA	CTTAAAGGAA	TTGACGGGG
M bovigenitalium	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTTGAAGATA	CGCGTAGAAC	CTTACCCACT	CTTGACATCT	TCTGCAAAGC	TATAGAGAT
M spp serogrupo 11	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTTGAAGATA	CGCGTAGAAC	CTTACCCACT	CTTGACATCT	TCTGCAAAGC	TATAGAGAT
120 ov F P1	CGGTGGAGCA	TGTGGTTTAA	TTTGAAGATA	CGCGTAGAAC	CTTACCCACT	CTTGACATCT	TCTGCAAAGC	TATAGAGAT
M bovigenitalium	TAACAGAATG	ACAGATGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT	GTTTCGGTTAA	GTCCTGCAAC	GAGCGCAAC
M spp serogrupo 11	TAACAGAATG	ACAGATGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT	GTTTCGGTTAA	GTCCTGCAAC	GAGCGCAAC
120 ov F P1	TAACAGAATG	ACAGATGGTG	CATGGTTGTC	GTCAGCTCGT	GTCGTGAGAT	GTTTCGGTTAA	GTCCTGCAAC	GAGCGCAAC
M bovigenitalium	GTTACTAACA	TTTCAAGTTAG	CACTCTAGGG	AGACTGCCCG	AGTAATCGGG	AGGAAGGTGG	GGACGACGTC	AAATCATCA
M spp serogrupo 11	GTTACTAACA	T TTAGTTAG	CACTCTAGGG	AGACTGCCCG	AGTAATCGGG	AGGAAGGTGG	GGACGACGTC	AAATCATCA
120 ov F P1	GTTACTAACA	TTTCAAGTTAG	CACTCTAGGG	AGACTGCCCG	AGTAATCGGG	AGGAAGGTGG	GGACGACGTC	AAATCATCA
M bovigenitalium	AGTGGGGCCA	CACACGTGCT	ACAATGGCCG	GTACAAAGTG	AAGCAACCTG	GTGACAGTGA	GCAAACCACA	AAAAGCCGG
M spp serogrupo 11	AGTGGGGCCA	CACACGTGCT	ACAATGGCCG	GTACAAAGTG	AAGCAACCTG	GTGACAGTGA	GCAAACCACA	AAAAGCCGG
120 ov F P1	AGTGGGGCCA	CACACGTGCT	ACAATGGCCG	GTACAAAGTG	AAGCAACCTG	GTGACAGTGA	GCAAACCACA	AAAAGCCGG
M bovigenitalium	ATTGGAGTCT	GCAACTCGAC	TCCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGTA	GATCAGCTAC	GCTACGGTGA	ATACGTTCT
M spp serogrupo 11	ATTGGAGTCT	GCAACTCGAC	TCCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGTA	GATCAGCTAC	GCTACGGTGA	ATACGTTCT
120 ov F P1	ATTGGAGTCT	GCAACTCGAC	TCCATGAAGT	CGGAATCGCT	AGTAATCGTA	GATCAGCTAC	GCTACGGTGA	ATACGTTCT
M bovigenitalium	CACACCGCCC	GTCAAACCAT	GGGAGCTGGT	AATGCCCGAA	GTCGGTTTAT	TAACAAACTG	CCTAAGGCAG	GACTG 1421
M spp serogrupo 11	CACACCGCCC	GTCAAACCAT	GGGAGCTGGT	AATGCCCGAA	GTCGGTTTAT	TAACAAACTG	CCTAAGGCAG	GACTG 1421
120 ov F P1	CACACCGCCC	GTCAAACCAT	GGGAGCTgT	AATGCCCGAA	GTCGGTTTAT	- AACAAACTG	CCTAAGGCAG	- ACTG 1423

Figura 32 - Alinhamento da seqüência primárias de nucleotídeos dos produtos obtidos pelos “primers” R16S, F16S, RCO3, RCO4, RCO5 e RCO6, do gene 16S rRNA de isolado de micoplasma obtido de muco vulvovaginal da espécie ovina com problemas reprodutivos, *Mycoplasma ovine/caprino* sorogrupo 11 (GenBank nº AY121094). e *Mycoplasma bovigenitalim* (GenBank nº AY121098) ov: ovino; F: fêmea; P: propriedade

		20		40		60		80	
47 ov F P2	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
3012 ov F P1	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
4 cap F P4	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
1004 ov M P1	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
45 ov F P3	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
49 ov F P2	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
U diversum 49782	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
U diversum 49783	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
Ureaplasma diversum	ATACATGCAAATCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								79
S/N ov F P5	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
45A ov F P5	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
128 ov F P6	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
11 ov F P5	ATACATGCAA - TCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								78
U canigenitalium	ATACATGCAAATCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								79
Ureaplasma cati	ATACATGCAAATCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								79
U urealyticum T960	ATACATGCAAATCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								79
U urealyticum sorovar 5	ATACATGCAAATCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								79
U urealyticum sorovar 7	ATACATGCAAATCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								79
Ureaplasma gallorale	ATACATGCAAATCGAACGAAGCC - TTTTGGCTTAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTATCCAATCTACCCCTTAAGTTT								79
M sp serogruppo 11	ATACATGCAATGTCGAGCGAAGTGATTTATCACTTA - CGGCGAATGGGTGAGTAACACGTATCAACGTAACCCCTTCAAGTTT								80
120 ov F P1	ATACATGCAATGTCGAGCGAAGTGATTTATCACTTA - CGGCGAATGGGTGAGTAACACGTATCAACGTAACCCCTTCAAGTTT								79
		100		120		140		160	
47 ov F P2	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								155
3012 ov F P1	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								155
4 cap F P4	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								155
1004 ov M P1	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								155
45 ov F P3	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								155
49 ov F P2	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								155
U diversum 49782	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								155
U diversum 49783	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								155
Ureaplasma diversum	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGGATAATAACATT - TGCTTGCATGAGTGA - ATGTAGAAAGTTGCGTTT								156
S/N ov F P5	GGGATAACTGGTCGAAAGACTAGCTAATACCAATAATAACAC - GTTTCGCATGAGATG - TTGTAGAAAGTTGCGTTT								155
45A ov F P5	GGGATAACTGGTCGAAAGACTAGCTAATACCAATAATAACAC - GTTTCGCATGAGATG - TTGTAGAAAGTTGCGTTT								155
128 ov F P6	GGGATAACTGGTCGAAAGACTAGCTAATACCAATAATAACAC - GTTTCGCATGAGATG - TTGTAGAAAGTTGCGTTT								155
11 ov F P5	GGGATAACTGGTCGAAAGACTAGCTAATACCAATAATAACAC - GTTTCGCATGAGATG - TTGTAGAAAGTTGCGTTT								155
U canigenitalium	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCAATAATAACATCAATATCGCATGAGA - AGATGTAGAAAGTTGCGTTT								158
Ureaplasma cati	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCAATAATAACATCAATATCGCATGAGA - AGATGTAGAAAGTTGCGTTT								158
U urealyticum T960	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCAATAATAACATCAATATCGCATGAGA - AGATGTAGAAAGTTGCGTTT								157
U urealyticum sorovar 5	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCAATAATAACATCAATATCGCATGAGA - AGATGTAGAAAGTTGCGTTT								157
U urealyticum sorovar 7	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCAATAATAACATCAATATCGCATGAGA - AGATGTAGAAAGTTGCGTTT								158
Ureaplasma gallorale	GGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCAATAATAACATCAATATCGCATGAGA - AGATGTAGAAAGTTGCGTTT								157
M sp serogruppo 11	GGCATAGCGGTTGGAAACACCGGATAAATTC - AAATACT - CGTAGATGCCGATGGCATTTACGGAAGGA - - - CGCCTT								155
120 ov F P1	GGCATAGCGGTTGGAAACACCGGATAAATTC - AAATACT - CGTAGATGCCGATGGCATTTACGGAAGGA - - - CGCCTT								155
		180		200		220		240	
47 ov F P2	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
3012 ov F P1	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
4 cap F P4	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
1004 ov M P1	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
45 ov F P3	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
49 ov F P2	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
U diversum 49782	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
U diversum 49783	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
Ureaplasma diversum	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								233
S/N ov F P5	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
45A ov F P5	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
128 ov F P6	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
11 ov F P5	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								232
U canigenitalium	- - - GCGACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								235
Ureaplasma cati	- - - GCGACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								234
U urealyticum T960	- - - GCGACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								233
U urealyticum sorovar 5	- - - GCGACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								234
U urealyticum sorovar 7	- - - GCGACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								234
Ureaplasma gallorale	- - - GCGACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								238
M sp serogruppo 11	- - - GCAACGCTTTTGGATGAGGGTGCGACGTATCAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								234
120 ov F P1	AAAGCGTCGCTGGAGGAGCGGGGTGCGCAACATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGTCAATTGACGCGTAGCT								235
		260		280		300		320	
47 ov F P2	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
3012 ov F P1	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
4 cap F P4	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
1004 ov M P1	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
45 ov F P3	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
49 ov F P2	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
U diversum 49782	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
U diversum 49783	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
Ureaplasma diversum	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								313
S/N ov F P5	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
45A ov F P5	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
128 ov F P6	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
11 ov F P5	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								312
U canigenitalium	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								315
Ureaplasma cati	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								313
U urealyticum T960	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								314
U urealyticum sorovar 5	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								314
U urealyticum sorovar 7	GTACTGAGAGGTAGAACAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTTTCA								318
Ureaplasma gallorale	GGGTTGAGAGACTGATCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTCCA								315
M sp serogruppo 11	GGGTTGAGAGACTGATCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTCCA								315
120 ov F P1	GGGTTGAGAGACTGATCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATTTTCCA								315

		340		360		380		400	
47 ov F P2	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
3012 ov F P1	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
4 cap F P4	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
1004 ov M P1	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
45 ov F P3	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
49 ov F P2	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
U diversum 49782	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
U diversum 49783	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
Ureaplasma diversum	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							392	
S/N ov F P5	CAATGGGCGCAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - CGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
45A ov F P5	CAATGGGCGCAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - CGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
128 ov F P6	CAATGGGCGCAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - CGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
11 ov F P5	CAATGGGCGCAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - CGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							391	
U canigenitalium	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							394	
Ureaplasma cati	CAATGGGCGAAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							392	
U urealyticum T960	CAATGGGCGCAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							393	
U urealyticum sorovar 5	CAATGGGCGCAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							393	
U urealyticum sorovar 7	CAATGGGCGCAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							397	
Ureaplasma gallorale	CAATGGGCGCAAGCCTTATGAAGCAATGCCGCGTGAACGATGAAGGTCTATA - AGATTGTAAAGTCTTTTATTTGGGAA							393	
M sp serogruppo 11	CAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCCCTATGCGTTGTAAAGTCTGCTGGTACAGGGA							395	
120 ov F P1	CAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCCCTATGCGTTGTAAAGTCTGCTGGTACAGGGA							395	
		420		440		460		480	
47 ov F P2	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
3012 ov F P1	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
4 cap F P4	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							469	
1004 ov M P1	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
45 ov F P3	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
49 ov F P2	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
U diversum 49782	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
U diversum 49783	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
Ureaplasma diversum	GAACC - ACTAAAATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							469	
S/N ov F P5	GAA TGT - CTAGAATAGGAAATGATT - CTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
45A ov F P5	GAA TGT - CTAGAATAGGAAATGATT - CTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
128 ov F P6	GAA TGT - CTAGAATAGGAAATGATT - CTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
11 ov F P5	GAA TGT - CTAGAATAGGAAATGATT - CTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							468	
U canigenitalium	GAAAC - GTTTAATAGGAAATGATT - TTAATTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							471	
Ureaplasma cati	GAAAT - GTTAAATAGGAAATGATT - TTAAC TTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							469	
U urealyticum T960	GAAAC - GCTAAGATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							470	
U urealyticum sorovar 5	GAAAC - GCTAAGATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							470	
U urealyticum sorovar 7	GAAAC - GCTAAGATAGGAAATGATT - TTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							474	
Ureaplasma gallorale	GAA - T - GCTAAGATAGTAAATGATTATTTAGTTTGACTGTACCAT - TTGAATAAGTATCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							470	
M sp serogruppo 11	ATAAAAAATAGTGTAGGAAATGCCACT - ATATTGAATGTACCTTATTA - GAAAGCAACGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							471	
120 ov F P1	ATAAAAAATAGTGTAGGAAATGCCACTTATTTAGGAATGTACCTTATTACGAAGCAACGGCTAACTATGTGCCAGCAGCC							475	
		500		520		540		560	
47 ov F P2	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
3012 ov F P1	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
4 cap F P4	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							549	
1004 ov M P1	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
45 ov F P3	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
49 ov F P2	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
U diversum 49782	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
U diversum 49783	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
Ureaplasma diversum	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							549	
S/N ov F P5	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
45A ov F P5	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
128 ov F P6	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
11 ov F P5	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGATTTCGTAAGTTTGGTATG							548	
U canigenitalium	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGTTCTGCAAGTTTGGTATG							551	
Ureaplasma cati	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGTTCTACAAGTTTGGTATG							549	
U urealyticum T960	NCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGTTTGTAAAGTTTGGTATG							550	
U urealyticum sorovar 5	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGTTTGTAAAGTTTGGTATG							550	
U urealyticum sorovar 7	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGTTTGTAAAGTTTGGTATG							554	
Ureaplasma gallorale	GCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGAGCGCAGGCGGTTTGTAAAGTTTGGTATG							550	
M sp serogruppo 11	GCGGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGCTGTAGTTGTTTGTAGCTGCGGCT							551	
120 ov F P1	GCGGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAACGCTGTAGTTGTTTGTAGCTGCGGCT							555	
		580		600		620		640	
47 ov F P2	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
3012 ov F P1	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
4 cap F P4	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							627	
1004 ov M P1	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
45 ov F P3	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
49 ov F P2	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
U diversum 49782	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
U diversum 49783	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
Ureaplasma diversum	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							627	
S/N ov F P5	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
45A ov F P5	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
128 ov F P6	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
11 ov F P5	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							626	
U canigenitalium	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTACGAATCTAGAGTGTAGTAGCGAAT - TGGGGAACCTCCATGTG							629	
Ureaplasma cati	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTGTAAACCTAGAGTGTAGTAGGGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							627	
U urealyticum T960	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTGTAAACCTAGAGTGTAGTAGGGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							628	
U urealyticum sorovar 5	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTGTAAACCTAGAGTGTAGTAGGGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							628	
U urealyticum sorovar 7	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTGTAAACCTAGAGTGTAGTAGGGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							632	
Ureaplasma gallorale	- AAATCTAGATGCTTAACGCTAGCTGTATCAAAAACTTACAATCTAGAGTGTAGTAGAGAGT - TGGGGAACCTCCATGTG							628	
M sp serogruppo 11	- AAATTTTGGGCTCAACCCCAACCGCGTTGGATACTGGCAGACTAGAGTTATGTAGAGTTA - GCGGAA - TTCCTTGT							628	
120 ov F P1	CAAAATTTTGGGCTCAACCCCAACCGCGTTGGATACTGGCAGACTAGAGTTATGTAGAGTTACGCGGAAATTCCTGT							635	

		660	680	700	720	
47 ov F P2	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTAC - TGACGCTTAG	701	
3012 ov F P1	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTAC - TGACGCTTAG	701	
4 cap F P4	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTAC - TGACGCTTAG	702	
1004 ov M P1	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTAC - TGACGCTTAG	701	
45 ov F P3	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTAC - TGACGCTTAG	701	
49 ov F P2	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTAC - TGACGCTTAG	701	
U diversum 49782	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTAC - TGACGCTTAG	701	
U diversum 49783	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTAC - TGACGCTTAG	701	
Ureaplasma diversum	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATTCCCTGACGCTTAG	703	
S/N ov F P5	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTAGCAC - TGACGCTTAG	701	
45A ov F P5	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTAGCAC - TGACGCTTAG	701	
128 ov F P6	GGAGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTAGCAC - TGACGCTTAG	702	
11 ov F P5	GAGCGGTAAAAATGCGTAA - GAATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTAGCAC - TGACGCTTAG	702	
U canigenitalium	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATACACTGACGCTTAG	705	
Ureaplasma cati	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATACACTGACGCTTAG	703	
U urealyticum T960	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATACACTGACGCTTAG	703	
U urealyticum sorovar 5	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATACACTGACGCTTAG	703	
U urealyticum sorovar 7	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATATGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATACACTGACGCTTAG	707	
Ureaplasma gallorale	G - AGCGGTAAAAATGCGTAG - ATATACGGAAGAACACCGG -			TGGCGAAGGCGCCAACCTGGACTATACACTGACGCTTAG	703	
M sp serogruppo 11	GAGCGGTGAAATGCGTAG - ATATAAGGAAGAACACCAACACTGGCGAAGGCGAGCTAAGCTGGACATACAC - TGACACTGAG				706	
120 ov F P1	GAGCGGTGAAATGCGTAGCATATAGGAAGAACACCAACTGGCGAAGGCGAGCTAAGCTGGACATACAC - TGACACTGAG				714	
		740	760	780	800	
47 ov F P2	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
3012 ov F P1	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
4 cap F P4	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				781	
1004 ov M P1	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
45 ov F P3	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
49 ov F P2	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
U diversum 49782	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
U diversum 49783	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
Ureaplasma diversum	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				782	
S/N ov F P5	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
45A ov F P5	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				780	
128 ov F P6	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				781	
11 ov F P5	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				781	
U canigenitalium	GCTCGAAAAGTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				785	
Ureaplasma cati	GCTCGAAAAGTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				783	
U urealyticum T960	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				782	
U urealyticum sorovar 5	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				781	
U urealyticum sorovar 7	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				786	
Ureaplasma gallorale	GCTCGAAA - GTGTGGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACACCGTAAACGATCATCATTAAATGTCGGCTC				782	
M sp serogruppo 11	AGACGAAA - GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTTGATCATTAA - - - - - GCTG				778	
120 ov F P1	AGACGAAA - GCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGTTGATCATTAA - - - - - GCTG				787	
		820	840	860	880	
47 ov F P2	GATTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
3012 ov F P1	GATTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
4 cap F P4	GATTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				860	
1004 ov M P1	GATTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
45 ov F P3	GATTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
49 ov F P2	GATTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
U diversum 49782	GATTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
U diversum 49783	GATTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
Ureaplasma diversum	GCTTATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				861	
S/N ov F P5	GATTAAAGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
45A ov F P5	GATTAAAGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
128 ov F P6	GATTAAAGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				860	
11 ov F P5	GATTAAAGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				860	
U canigenitalium	GGA - - TGGTTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGTAGAATGAAACTCAAACGGA				862	
Ureaplasma cati	GGA - ATGGTTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				861	
U urealyticum T960	GA - - ACGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
U urealyticum sorovar 5	GA - - ACGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				858	
U urealyticum sorovar 7	GA - - ATGGTTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				863	
Ureaplasma gallorale	GA - - ATGAGTCGGTGTGTAGCTAACGCATTAATGATGTGCCTG - GGTAGTACATTGCGAAGAATGAAACTCAAACGGA				859	
M sp serogruppo 11	ATGGGGAACTCATCGGCCAGCTAACGCATTAATGATCCGCTGACGAGTAGTACGTTTCGCAAGAATAAACTTAA - AAGGA				856	
120 ov F P1	ATGGGGAACTCATCGGCCAGCTAACGCATTAATGATCCGCTGACGAGTAGTACGTTTCGCAAGAATAAACTTAACTACAGGA				867	
		900	920	940	960	
47 ov F P2	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
3012 ov F P1	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
4 cap F P4	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				940	
1004 ov M P1	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
45 ov F P3	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
49 ov F P2	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
U diversum 49782	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
U diversum 49783	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
Ureaplasma diversum	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				941	
S/N ov F P5	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACGATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
45A ov F P5	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACGATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
128 ov F P6	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACGATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				940	
11 ov F P5	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACGATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				940	
U canigenitalium	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGCGGATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				942	
Ureaplasma cati	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				941	
U urealyticum T960	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
U urealyticum sorovar 5	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				938	
U urealyticum sorovar 7	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				943	
Ureaplasma gallorale	ATTGACGGGGACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAACCCTACCTAGGTTTGACATC				939	
M sp serogruppo 11	ATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGAGATACGCTAGAACCCTACCTACCTCTTGACATC				936	
120 ov F P1	ATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGAGATACGCTAGAACCCTACCTACCTCTTGACATC				947	

		980	1,000	1,020	1,040
47 ov F P2	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT - AACAAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1018
3012 ov F P1	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
4 cap F P4	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1020
1004 ov M P1	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
45 ov F P3	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
49 ov F P2	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
U diversum 49782	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
U diversum 49783	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1016
Ureaplasma diversum	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1021
S/N ov F P5	TATTGCAAGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
45A ov F P5	TATTGCAAGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
128 ov F P6	TATTGCAAGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTG - TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
11 ov F P5	TATTGCAAGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1020
U canigenitalium	TATTGCAAGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1022
Ureaplasma cati	TATTGCAATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1021
U urealyticum T960	TATTGCGACGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
U urealyticum sorovar 5	TATTGCGACGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1018
U urealyticum sorovar 7	TATTGCGATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1023
Ureaplasma gallorale	TATTGCGATGCTATAGAAAATATAGCGGAGGT TAACAATATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1019
M sp serogrupo 11	TCTGCAAGCTATAGAGATATAGCGGAGGT TAACAAGATGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1016
120 ov F P1	TCTGCAAGCTATAGAGATATAGCGGAGGT TAACAAGATGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGA				1027
		1,060	1,080	1,100	1,120
47 ov F P2	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1084
3012 ov F P1	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1085
4 cap F P4	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1086
1004 ov M P1	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1085
45 ov F P3	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1085
49 ov F P2	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1085
U diversum 49782	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1085
U diversum 49783	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1082
Ureaplasma diversum	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1087
S/N ov F P5	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1085
45A ov F P5	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1085
128 ov F P6	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1085
11 ov F P5	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTA - - - - - TCTATCGATACTGCTA				1086
U canigenitalium	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTT - - - - - CTATCGATACTGCTA				1088
Ureaplasma cati	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - ATTTT - - - - - ACCATCGATACTGCT -				1086
U urealyticum T960	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTG - - - - - CTTT - - - - - TCTAGCGATACTGCTA				1084
U urealyticum sorovar 5	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTG - - - - - CTTT - - - - - TCTAGCGATACTGCTA				1083
U urealyticum sorovar 7	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - CTTT - - - - - TCTAGCGATACTGCTA				1088
Ureaplasma gallorale	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTTCGCTAGTTA - - - - - CTTT - - - - - TCTAGCGATACTGCTA				1085
M sp serogrupo 11	TGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTAGTTACTAACATTTAGTTGAGCACCTAGGAGAGACTGCC				1086
120 ov F P1	TGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTAGTTACTAACATTCAGTTGAGCACCTAGGAGAGACTGCC				1107
		1,140	1,160	1,180	1,200
47 ov F P2	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1164
3012 ov F P1	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
4 cap F P4	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1166
1004 ov M P1	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
45 ov F P3	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
49 ov F P2	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
U diversum 49782	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
U diversum 49783	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1162
Ureaplasma diversum	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1167
S/N ov F P5	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
45A ov F P5	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
128 ov F P6	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
11 ov F P5	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1166
U canigenitalium	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1168
Ureaplasma cati	CTGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1166
U urealyticum T960	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1164
U urealyticum sorovar 5	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1163
U urealyticum sorovar 7	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1168
Ureaplasma gallorale	CCGCAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATATCTAGGGCTGCAAAACGTGCTACAATGGCT				1165
M sp serogrupo 11	GAGTAA TCGGAGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTCTTACGAGTGGGGCCACACACGTGCTACAATGGCC				1176
120 ov F P1	GAGTAA TCGGAGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTCTTACGAGTGGGGCCACACACGTGCTACAATGGCC				1187
		1,220	1,240	1,260	1,280
47 ov F P2	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1244
3012 ov F P1	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1245
4 cap F P4	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1246
1004 ov M P1	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1245
45 ov F P3	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1245
49 ov F P2	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1245
U diversum 49782	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1245
U diversum 49783	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1242
Ureaplasma diversum	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1247
S/N ov F P5	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1245
45A ov F P5	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1245
128 ov F P6	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1245
11 ov F P5	AATACAAACAGCTGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1246
U canigenitalium	ATTACAAACCTTGGCAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1248
Ureaplasma cati	AATACAAAGTTCGCTACTTTCGTAAGAGATGCCAATCACATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1246
U urealyticum T960	AATACAAACCTGCTGCAAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1244
U urealyticum sorovar 5	AATACAAACCTGCTGCAAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1243
U urealyticum sorovar 7	AATACAAACCTGCTGCAAAAACCGTAAGGTGGAGCGAATCTGATAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1248
Ureaplasma gallorale	AATACAAATTCGCTGCAATACCGTAAGGTGGAGCGAATCTA - AAAAAAGTTAGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1244
M sp serogrupo 11	GGTACAAAGGTGAAGCAACCTGGTGACAGTGAGCAAAACACAAAGGCGGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1256
120 ov F P1	GGTACAAAGGTGAAGCAACCTGGTGACAGTGAGCAAAACACAAAGGCGGTCTCAGTTCGGATAGAGGGCTGCAATTTCGC				1267

Figura 33 - Alinhamento das seqüências primárias de nucleotídeos dos produtos obtidos pelos “primers” R16S, F16S, RCO3, RCO4, RCO5 e RCO6, do gene 16S rRNA de ureaplasma e micoplasma isolados de muco vulvovaginal e sêmen das espécies caprina/ovina com problemas reprodutivos, cepas de referência e cepas depositadas no GenBank. ov: ovino; cap: caprino; F: fêmea; M: macho; P: propriedade

5.6.7 Análise do sequenciamento completo do gene 16S rRNA dos isolados clínicos e cepas de referência de ureaplasma

No dendograma (UPGMA) do sequenciamento completo do gene 16S rRNA com isolados e cepas de referência e ponto de corte $\geq 97\%$ para similaridade (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; KESWANI; WHITMAN, 2001; RAZIN; HERRMANN, 2002) foi possível observar claramente a formação de dois braços referente aos gêneros micoplasma e ureaplasma. No gênero *Ureaplasma* foi formado o braço A referente ao humano e B, a pequeno e grande ruminante (Figura 34). No dendograma, foram agrupados seis isolados clínicos (Figura 34, letra C), entre eles o de caprino, junto às espécies de *Ureaplasma diversum* (ATCC 49782 e 49783) com 98 a 100% de homologia. O braço D agrupou quatro isolados de ovinos, não relacionados ao *Ureaplasma diversum* (Figura 34).

Pairwise (DG:100%,UG:0%) (FAST2,10) Gapcost0%

Figura 34 - Dendograma (UPGMA) das seqüências primárias de nucleotídeos de isolados de ureaplasma e micoplasma obtidos de material clínico das espécies caprina e ovina e cepas de referência. Seta: ponto de corte $\geq 97\%$ considerado na similaridade intraespecífica. ov: ovino; cap: caprino; F: fêmea; M: macho; P: propriedade

No dendograma (UPGMA) do sequenciamento completo do gene 16S rRNA com isolados, cepas de referência e espécies de ureaplasmas e *Mycoplasma* ovine/caprino sorogrupo 11 (depositados no GenBank) e ponto de corte $\geq 97\%$ para similaridade (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; KESWANI; WHITMAN, 2001; RAZIN; HERRMANN, 2002), o gênero ureaplasma se dividiu em espécies em 93,6%. As espécies de *U. canigenitalium* e *U. cati* foram divididas a 94,8%; as de humano e *U. gallorale* a 96,5%. Os ureaplasmas de pequeno e grande ruminante foram divididos a 96,7% de similaridade (Figura 35).

Figura 35 - Dendograma obtidos, pelo UPGMA, de seqüências primárias de nucleotídeos de isolados clínicos das espécies caprina/ovina, cepas de referência de ureaplasma (*U. diversum* ATCC 49782, 49783 e *U. urealyticum* T960) e espécies de ureaplasmas e *Mycoplasma* ovine/caprino sorogrupo 11 depositados no GenBank. Seta: ponto de corte $\geq 97\%$ considerado na similaridade intraespecífica. ov: ovino; cap: caprino; F: fêmea; M: macho; P: propriedade; sor: sorogrupo

5 DISCUSSÃO

O mercado de produtos caprinovinos encontra-se em franca expansão, ao nível estadual, nacional e internacional. Dentre os produtos agropecuários com potencialidade no mercado externo, configuram-se as carnes caprina e ovina. Nos países, que apresentam alta renda *per capita*, é crescente a demanda por carnes, e o Brasil, poderia se transformar em importante exportador desses produtos (SIMPLICIO, 2006).

Segundo Fonseca (2005), a caprinovinocultura está apresentando um ciclo de crescimento mundial, que se intensificou nas últimas décadas, sobretudo em países em desenvolvimento, atualmente, detentores dos maiores rebanhos. A tendência mundial indica uma multiplicação da ordem de cinco vezes o rebanho brasileiro atual para os próximos vinte anos. Dentro desta perspectiva, haverá ampla necessidade de assessorar a reprodução destes animais objetivando o aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos e a multiplicação mais eficiente dos genótipos de qualidade. A denominativa reprodução refere-se ao ato de reproduzir, proporcionando e gerando novos descendentes, o que dentro de um sistema produtivo, pode ser entendido como ampliação do rebanho, permitindo a melhoria do potencial de produção quando os cruzamentos são bem conduzidos (RIBEIRO, 1997).

Alguns aspectos são cruciais para alcançar melhores índices de desenvolvimento na caprinovinocultura, e conseqüentemente, sua competitividade em um mercado em franca expansão. Estes se embasam em três pontos fundamentais da produção: manejo sanitário, nutricional e reprodutivo. Estes aspectos devem estar funcionando adequadamente, e para isto, os itens da cadeia de produção devem ser rigorosamente monitorados e avaliados, levando em consideração que as boas práticas de manejo refletem em lucros para o produtor e expansão da cadeia produtiva (GRANADOS et al., 2006).

O manejo sanitário busca preservar a saúde dos animais, controlando ou eliminando doenças, minimizando os riscos de modo a maximizar os índices produtivos e de rentabilidade do rebanho. Para que o controle sanitário e as medidas preventivas possam produzir resultados concretos e eficazes, faz-se necessário a

operacionalização eficiente de toda a estrutura do sistema de produção, em conformidade com as tecnologias disponibilizadas.

De maneira geral, esses animais são explorados tradicionalmente em sistemas de criação extensivo com reduzida adoção de tecnologia, o que tem sido responsabilizado pelos baixos índices zootécnicos. Estes índices podem ser traduzidos pela reduzida velocidade de crescimento dos animais, abate tardio, baixo rendimento de carcaça, que não satisfaz as exigências de mercado em termos de qualidade, idade avançada ao primeiro parto, longos intervalos entre partos, baixa produção leiteira e alta taxas de mortalidade nos rebanhos (SIMPLICIO, 2006).

Os distúrbios reprodutivos nos animais são importantes fatores que interferem na economia agropecuária e são normalmente originados das deficiências de manejo, falhas de origem genética, influências do meio ambiente e doenças infecciosas (BUZINHANI, 2001). O desenvolvimento de técnicas mais eficientes para o diagnóstico de distúrbios reprodutivos, que tem como causa os agentes infecciosos, é a primeira medida de obtenção de controle efetivo das doenças. Pesquisas relacionadas à epidemiologia dos microrganismos, bem como à patogenicidade, são necessárias para que se possa melhor compreender e controlar os distúrbios causados pelos agentes infecciosos (BUZINHANI, 2006). Os micoplasmas incluem-se entre os agentes causadores de infecções no trato reprodutivo dos animais (SHEPARD et al., 1974; RUHNKE et al., 1978; CARDOSO et al., 2001). Vários estudos demonstraram o isolamento de *M. agalactiae*, *M. sorovar 11*, *M. arginini*, *M. capricolum*, *M. mycoides mycoides* LC, *A. laidlawii* e *Ureaplasma* spp em trato genital de caprinos e ovinos sugerindo o potencial patogênico desses agentes nas infecções genitais (COTTEW et al., 1974; SINGH; et al., 1974; DOIG e RUHNKE, 1977; BALL e MCCAUGHEY, 1982; LIVINGSTON e GAUER, 1983; JONES et al., 1983, TRICHARD et al., 1993).

Nosso trabalho, a pesquisa de *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp. foi realizada a partir do material clínico mucovulvovaginal e sêmen de animais com distúrbios reprodutivos e saudáveis.

No cultivo realizado em meio SP4, para isolamento do gênero *Mycoplasma*, foram obtidos dois isolados (*Mycoplasma* spp.), um da espécie caprina e um para espécie ovina ambos de muco vulvovaginal. A identificação dos micoplasmas foi realizada de acordo com suas características de colônia, bases metabólicas, formação de filmes e manchas. O isolado identificado como 120 ov F P1, obtido de

material clínico mucovulvovaginal da espécie ovina, foi seqüenciado (região 16S rRNA) e comparado aos seqüenciamento depositado no GenBank. O isolado 120 ov F P1 apresentou homologia de 98% com *Mycoplasma* ovine/caprino sorogrupos 11 e *Mycoplasma bovis genitalium*. O *Mycoplasma* ovine/caprino sorogrupos 11 foi isolado em ovelhas com problemas reprodutivos (COTTEW et al., 1974; LIVINGSTON et al., 1983; NICHOLAS et al., 1999) e em rebanhos aparentemente saudáveis, não estabelecendo o papel etiológico deste agente (LIVINGSTON 1983, KAPOOR et al., 1984). RANA et al. (1993), em inoculação experimental com *Mycoplasma* ovine/caprino sorogrupos 11 em caprinos, observaram lesões severas de vulvovaginite granular (vesículas brancas e edema em mucosa vaginal), cervicite linfática, endometrite e leve ooforite, comprovando a patogenicidade deste agente para a espécie caprina. Entretanto, a patogenicidade de algumas espécies de micoplasmas tem sido questionada, principalmente quando encontradas em hospedeiros saudáveis ou associados a afecções não usuais (BUZINHANI, 2006). A atividade biológica, *in vitro*, dessas espécies, ou seus produtos, justificam parcialmente sua associação a certas doenças. Este aspecto mantém a comunidade científica atenta para a questão da falta de informação ou mesmo pela dificuldade de comprovação dos fatos (BASEMEN; TULLY, 1997). Louis Pasteur sugeriu pela primeira vez, a existência de um microrganismo causador da pleuropneumonia bovina. A doença foi devastadora nos rebanhos da Europa e foi mencionada inicialmente na Alemanha em 1963. O agente responsável pela enfermidade não crescia em meios de cultura usuais e era impossível a sua visualização em microscopia óptica comum. No entanto, em 1898, Edmon Nocard e Emile Roux isolaram micoplasma, pela primeira vez, de material pulmonar de bovinos com pleuropneumonia. Atualmente, aquele isolado é designado de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* e possui a mesma importância, desde a sua menção da doença, em 1963, não somente aos bovinos, mas aos caprinos e ovinos (HOUSHAYMI, 1997; TIMENETSKY, 2004).

Poucas espécies de micoplasmas são patógenos primários ou clássicos nos hospedeiros. Estas bactérias associam-se a diversas doenças cujos sinais clínicos podem manifestar-se de forma aguda, porém, normalmente apresenta curso crônico. A aderência dos micoplasmas à célula hospedeira é uma das principais características de patogenicidade e virulência dos micoplasmas. Esta propriedade

está entre as mais estudadas em algumas espécies, como a do *M. pneumoniae*, mencionada inicialmente na década de 70 (RAZIN, 1985).

O desenvolvimento da microbiota residente associado aos micoplasmas em animais ainda é pouco estudado (TIMENETSKY, 2004). A falta de associação entre as alterações no trato reprodutivo e a presença de micoplasma pode ser devido à formação de um sistema imune local que ocorre após infecção prévia do animal. Alguns autores propõem que uma segunda exposição ao agente desencadeie sinais clínicos mais brandos ou imperceptíveis, permanecendo o agente na mucosa e se manifestando mais efetivamente somente como um agente secundário a uma infecção com outro microrganismo patogênico. A presença de micoplasmas no trato reprodutivo dos animais, como de bovinos - espécie mais estudada - e a associação com patologias foi considerada controversa, pois animais sadios eram encontrados como portadores destas bactérias (RUHNKE; ROSENDAL, 1994; SANDERSON; CHENOWETH, 1999). Atualmente, os dados de infecções naturais e experimentais causando abortos e infertilidade em bovinos, além de surtos da síndrome de vulvovaginite granular (VVG) comprovaram a importância dos micoplasmas como patógenos do sistema reprodutivo (DOIG et al., 1979; REID et al., 1989; RUHNKE; ROSENDAL, 1994; SANDERSON; CHENOWETH, 1999).

No meio de cultivo UB, específico para ureaplasma, obteve-se 17 isolamentos de amostra de muco vulvovaginal e três de sêmen (*Ureaplasma* spp.) e sete mistos (*Ureaplasma* spp. e *Mycoplasma* spp.) para a espécie ovina. Para a espécie caprina obteve-se quatro isolamentos identificados como *Ureaplasma* spp., de material clínico vulvovaginal. Todos os isolados obtidos de caprinos e ovinos foram provenientes de animais apresentando distúrbios reprodutivos. Buzinhani (2006), utilizando meio de UB, obteve isolamento de *Ureaplasma diversum* em 28 (25%) amostras de muco vulvovaginal de bovinos com problemas reprodutivos. Este microrganismo foi primeiramente considerado como microbiota residente no trato genital de bovinos, não sendo implicado inicialmente, como agente de distúrbios reprodutivos (RUHNKE, 1984). Posteriormente, inoculações experimentais e estudos epidemiológicos comprovaram a associação do *U. diversum* a diversas alterações patológicas em bovinos (KREPLIN et al., 1987). Desde o primeiro relato de doença urogenital em ovinos associado com ureaplasma (DOIG; RUHNKE, 1977), ocorreram muitos outros relatos similares em outras partes do mundo (MCCAUGHEY; BALL 1979; MCCAUGHEY; BALL, 1981; JONES et al., 1983). Na

Irlanda do Norte, o ureaplasma foi isolado em esponjas vaginais para sincronização de cio em ovelhas sadias (MCCAUGHEY; BALL, 1979) e no mesmo país, este microrganismo foi associado à vulvite e vaginite com ulceração em vestibulo em estudo de transmissão experimental (MCCAUGHEY; BALL, 1982). Embora exista relato de isolamentos de ureaplasma em trato genital de ovelhas clinicamente normais (LIVINGSTON; GAUER, 1975; MCCAUGHEY; BALL, 1979, JONES et al., 1979, KOTANI et al., 1980; MCCAUGHEY; BALL, 1981, HOWARD; POCOCK, 1983), vários sorotipos têm sido associado a doenças em ovinos (COTTEW et al., 1974; LIVINGSTON; GAUER 1982). No primeiro relato de vulvite granular, Doig e Ruhnke (1977) sugeriram que certas cepas de ureaplasma estavam associadas a doenças. Livingston e Gauer (1978) isolaram, no rebanho do Texas, nove sorotipos diferentes, acreditando ser o sorotipo IX relacionado aos casos de infertilidade. Experimento realizado com ovelhas virgens observou um período maior da persistência dos ureaplasmas no trato reprodutivo (BALL; MCCAUGHEY, 1982). A habilidade dos ureaplasmas em induzirem doenças no trato genital foi confirmada por inoculações experimentais com cepas de ureaplasma isoladas de ovelhas com vulvites em ovelhas saudáveis, resultando em moderada granularidade e hiperemia na vulva (DOIG; RUHNKE 1977; BALL; MCCAUGHEY, 1982). O ureaplasma pode ser transmitido para ovelhas através da monta natural de carneiros infectados (LIVINGSTON; GAUER, 1982). McCaughey e Ball (1981) observaram maior incidência de isolamentos de ureaplasma na região vestibular da vulva.

Estudos com ureaplasma demonstraram que a infecção ocorre mais frequentemente em ovelhas velhas. Estas ovelhas têm papel importante na perpetuação da doença no rebanho, por permanecerem como portadoras assintomáticas por longos períodos após a infecção primária (MCCAUGHEY; BALL, 1981). A prevalência de micoplasmas e ureaplasmas genitais está relacionada ao tempo que os animais são mantidos no rebanho (LANGFORD, 1975; RIZZO, 2006). McCaughey e Ball (1983) sugeriram que ovelhas infectadas e submetidas a tratamento poderiam ser reservatórios, pois as ovelhas se reinfectavam, mesmo na ausência de carneiros.

Alguns autores citam que o aumento de isolados de ureaplasma em um rebanho está relacionado com fases de estresse que o animal é submetido como, tratamentos de sincronização de cio e parto (MCCAUGHEY; BALL, 1979; LIVINGSTON; GAUER, 1982). McCaughey e Ball (1985) compararam as alterações

fisiológicas do estro com as ocasionadas por ureaplasmas genitais e observaram que em ovelhas, naturalmente infectadas, tiveram o lábio vulvar significativamente mais avermelhado e edemaciado que as não infectadas. Os sinais clínicos de edema e eritema vulvar apresentados por animais infectados e não infectados são diferentes e, embora estatisticamente significativa, ainda não são exclusivos de vulvovaginite por ureaplasmas. Também em nosso estudo, o isolado “4 cap F P4” foi obtido de uma fêmea no pós-parto (sete dias) que apresentava ao exame físico hiperemia e edema vulvar exacerbado, quando comparado a fêmeas em pós-parto, do mesmo lote, negativas no cultivo.

Os micoplasmas e ureaplasmas têm sido isolado juntos ou separadamente em carneiros e ovelhas acometidos por doenças associadas a vulvovaginite (COTTEW et al., 1974), vulvovaginite e vulvite granular (DOIG; RUHNKE, 1977), vulvite (BALL; MCCAUGHEY, 1982) e balanopostite ulcerativa e vulvovaginite (TRICHARD et al., 1993). Lesões ulcerativas em vulva, pênis e prepúcio associados a sorotipos de micoplasma e ureaplasma têm sido descrito mundialmente (JONES et al., 1983). Culturas mistas de micoplasma e ureaplasma, em meio UB, foram obtidas de material clínico de mucovulvovaginal de ovinos apresentando distúrbios reprodutivos. Estes isolados não foram identificados devido à impossibilidade na clonagem de colônias. O crescimento de micoplasma em meio de cultura com pH abaixo dos requeridos por este gênero alerta a necessidade do aprimoramento de técnicas no cultivo destes agentes. Os ureaplasmas e micoplasmas são associados a distúrbios reprodutivos, entretanto, deve ser avaliada a possível existência de um sinergismo, entre estes gêneros, quando presentes no mesmo sítio anatômico.

A literatura referente à micoplasmose e ureaplasmose em ovinos e caprinos é escassa. No Brasil, somente em 2004 foi relatado o primeiro isolamento de *Ureaplasma* spp em sêmen e suabe vaginal de ovinos no estado de São Paulo (GREGORY et al., 2004). Não existem estudos de incidência e prevalência de micoplasmose e ureaplasmose em nosso rebanho. A prática de importação de animais de países como Austrália, Estados Unidos, África do Sul entre outros, onde já foram isoladas cepas consideradas patogênicas ao trato reprodutivo de ovinos e caprinos poderá ser um risco a entrada para a contaminação de nosso rebanho em franca expansão, se não forem tomadas medidas sanitárias preventivas.

O presente trabalho confirma a necessidade de estudos voltados a patogenicidade e epidemiologia desses microrganismos. Desta maneira, será

possível a melhor compreensão e controle dos distúrbios causados pelos *Mollicutes*. O diagnóstico das micoplasmoses e ureaplasmoses não é realizado em nosso país, dificultando avaliar a distribuição desses microrganismos em distúrbios reprodutivos de caprinos e ovinos.

O diagnóstico laboratorial de infecções causadas por micoplasmas é usualmente realizado pela detecção de anticorpos específicos ou cultivo. A alta variabilidade antigênica apresentada pelas espécies de micoplasmas dificultam os diagnósticos (YOGEV, 1991). O cultivo pode ser prejudicado pelo tipo de amostra clínica, método de coleta, transporte, tempo no processamento das amostras, exigências nutricionais e número de micoplasma e ureaplasma presentes na amostra clínica. Os esforços na detecção destes agentes em diferentes estágios da doença estão voltados para técnicas de biologia molecular, sendo a PCR de ampla aplicabilidade na medicina veterinária (BUZINHANI, 2001).

A técnica da PCR com “primers” genéricos, realizada com o DNA obtido de amostras de muco vulvovaginal e sêmen de caprinos e ovinos, foi utilizada na triagem para posterior identificação das espécies. Os resultados obtidos para as espécies caprinas e ovinas foram 76,66% e 73,28% respectivamente. A PCR apresentou maior detecção de animais contaminados por *Mollicutes* quando comparado ao isolamento. Os “primers” GPO3 e MGSO podem ter a capacidade de amplificar material genético de espécies de micoplasmas presentes no trato reprodutivo de ovinos/caprinos não cultiváveis pelos meios empregados. Van Kuppeveld et al. (1992) reportaram uma detecção de “1 pg”, quando utilizaram os “primers” GPO3 e MGSO com DNA de *M. pneumoniae*, evidenciando a alta sensibilidade desta técnica com esses “primers”.

Infecções experimentais com *M. synoviae*, em galinhas e perus, resultaram em 14,41% de culturas positivas e 47,91% de reações positivas na PCR com “primers” GPO3 e MGSO. De acordo com Van Kuppeveld et al. (1992), a PCR para classe *Mollicutes* detecta todas as espécies de micoplasmas, bem como membros do gênero *Ureaplasma*, *Spiroplasma* e *Acholeplasma*. No presente estudo, a PCR para *Acholeplasma laidlawii* e *Mycoplasma arginini* apresentou baixo percentual de animais contaminados.

A introdução da tecnologia genética, no estudo dos micoplasmas vem assessorando na classificação de novas espécies, desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e auxílio no conhecimento dos processos pelos quais esses

microrganismos alteram a integridade fisiológica das células hospedeiras (YAMAMOTO et al., 1994; DYBVIG; VOELKER, 1996).

A caracterização de linhagens patogênicas é fundamental para fins epidemiológicos. Nas últimas décadas, a identificação de linhagens bacterianas baseada em características fenotípicas cedeu espaço para as abordagens genotípicas por técnicas de biologia molecular e, entre elas o PFGE é uma das mais aceitas e utilizadas (TENOVER et al, 1995; MIRAGAIA et al., 2002).

O parâmetro para a separação de fragmentos digeridos dependerá do microrganismo, da enzima e do aparelho da PFGE. A adequação destas condições poderá ser realizada de adaptações de protocolos publicados ou empiricamente (STRUELENS et al., 2001). Existem fatores críticos que interferem na obtenção do DNA cromossomal íntegro na digestão enzimática como: tampões de lavagens e tempo de centrifugação. Para otimização da PFGE, destinada a tipificação de ureaplasma ovino, foram utilizados os parâmetros fixados por Buzinhani et al. (2006) única publicação, até o momento, para tipificação de espécie de ureaplasma em ruminantes.

O tempo de centrifugação das culturas de ureaplasma foi aumentado para melhor sedimentação das células de ureaplasma, que apresentam tamanho reduzido, bem como a utilização de tampão de lavagem sem Tris e EDTA. O uso de tampão com Tris tem sido relatado como agente de degradação do DNA, e alguns autores obtiveram melhores resultados com solução tamponante de PBS ou solução fisiológica (STAKENBORG et al., 2005; MOSER et al., 2006). Outro aspecto importante no preparo das moléculas de DNA cromossômico de alto peso molecular é a proteção do material contra DNAses que são ativadas pela lise celular. Com este intuito é usada uma solução contendo um agente quelante em alta concentração (EDTA 0,5 M), que seqüestra os íons de magnésio que atuam como co-fatores das DNAses. (MAGALHÃES et al., 2005). Desta forma, as células de ureaplasma foram lavadas em solução PBS (pH 7,2) e ressuspensas em tampão contendo EDTA para evitar a degradação do DNA por DNAses. Na preparação do tampão para o gel e corrida eletroforética foi adicionado “Thioure” para neutralizar os radicais de Tris, conforme descrito por Struelens et al. (2001). O programa de eletroforese foi otimizado para adequar a separação dos fragmentos de DNA para os ureaplasma isolados de ovinos. O programa XI foi o que permitiu melhor visualização dos fragmentos de DNA dos ureaplasma e marcador de peso molecular.

As alterações nos parâmetros para a PFGE, aplicadas aos isolados de ureaplasma de ovino e caprino, permitiu a tipificação de 50% dos isolados de ovinos. Marois et al. (2001) e Buzinhani (2006) relataram a impossibilidade de tipificação de 100% dos isolados de *M. synoviae* e *U. diversum*, respectivamente. Segundo Buzinhani (2006) a ausência de perfil de fragmentos de DNA de alguns isolados de ureaplasmas bovino pode ser justificada pela quantidade insuficiente de DNA. Entre os gêneros pertencentes à classe *Mollicutes* os ureaplasma apresentam crescimento rápido e tempos de crescimento variáveis entre os isolados, sensibilidade a alterações de pH e fragilidade osmótica devido à ausência de parede. A PFGE dos 11 isolados de ovinos resultou em oito diferentes perfis confirmando a capacidade da técnica em tipificar ureaplasma de origem ovina sendo útil, no futuro, em estudos epidemiológicos das ureaplasmoses nesta espécie animal.

A identificação rápida e confiável de isolados clínicos continua sendo o objetivo mais importante nos estudos taxonômicos. Nos últimos anos, o interesse renovado nos estudos de taxonomia microbiana deve muito ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, que aumentaram significativamente a disponibilidade de métodos que permitam a identificação e classificação mais rápida e precisa de microrganismos. Neste grupo de análise genotípica estão todas as metodologias direcionadas ao estudo das moléculas de DNA ou RNA. Através da aplicação de tecnologias baseadas em PCR, seqüenciamento automatizado, eletroforese de “pulse-field” e sondas de oligonucleotídeos, a velocidade de geração de dados é impressionante (STRALIOTTO, 1997).

Os ureaplasmas de ovino apresentam o conteúdo de DNA e polipeptídeos similar ao *U. diversum*, entretanto, ainda não receberam designação de espécie e sua classificação é fundamentada em métodos fenotípicos.

Para detectar as diferenças ou similaridades entre os isolados de ureaplasma de origem ovina e caprina aos de origem bovina e humana foi realizado sequenciamento completo do gene 16S rRNA. A seqüência do genoma bacteriano é a base de comparação por excelência, mas na impossibilidade da sua completa determinação, tem sido válida a análise sistemática da seqüência da subunidade 16S rRNA ou da seqüência do gene que codifica esta estrutura no DNA genômico. O sequenciamento do gene que codifica o 16S rRNA permite proceder à elaboração de árvores filogenéticas onde se podem colocar vários grupos evolutivos de bactérias próximos e observar as suas relações de ancestralidade (BROWN et al., 1995).

O seqüenciamento dos produtos da PCR de fragmentos de DNA, acima de 700 bases, apresenta como dificuldade a obtenção de leituras fidedignas de todo o produto. O produto de 1500 pb obtido da amplificação de DNA de ureaplasmas, com os “primers” universais descrito por Harasawa e Cassel (1996), quando seqüenciados, não apresentou leitura de aproximadamente 600 bases referente à região interna do gene 16S rRNA. Desta forma foram desenvolvidos os “primers” RCO3/RCO4, que apresentam seqüências de nucleotídeos homólogas aos gêneros de ureaplasma e micoplasma e que amplifica um do fragmento de aproximadamente 700 bases. Adicionalmente o sequenciamento do gene 16S rRNA foi concluído com o desenvolvimento dos “primers” RCO5 e RCO6 utilizados com F16S e R16S, respectivamente.

Na análise dos seqüenciamentos do gene 16S rRNA de ureaplasma de ovinos e caprinos e das referências de *U. diversum* e *U. urealyticum* foi possível o agrupamento dos isolados clínicos com as referências de origem bovina, concordando com os dados descritos na literatura (HOWARD et al., 1978; KOTANI et al., 1980; HOWARD ; POCOCK, 1983). Entretanto, quatro dos isolados clínicos foram agrupados em um braço, isolado das referências, com similaridade entre eles de 99 a 100%.

Quando analisado o dendograma (UPGMA) do sequenciamento completo do gene 16S rRNA dos 11 isolados clínicos, cepas de referência e espécies de ureaplasmas e *Mycoplasma* ovine/caprino sorogrupo 11 (depositados no GenBank) observou-se que os quatro isolados permaneceram em um braço com similaridade entre 99,4 a 100%. Estes isolados não foram agrupados às espécies de ureaplasma de origem bovina, humana, felina, canina e aviária, quando utilizado o ponto de corte $\geq 97\%$ (STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994; KESWANI; WHITMAN, 2001; RAZIN; HERRMANN, 2002) considerado na similaridade interespecífica. A utilização do gene 16S rRNA, como ferramenta filogenética, tem resultado em um grande número de seqüências depositadas em bancos públicos de dados. O seqüenciamento de genes é uma técnica que facilita a genotipagem de espécie, devido ao uso de pequenas concentrações de DNA. A utilização do gene 16S rRNA gera grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas e pode ser a primeira escolha na investigação de novas espécies (STAHL, 1997; JOHANSSON; PETTERSSON, 2002). Desta forma, os quatro isolados de ovino, não agrupados com as espécies de ureaplasma, pode ser indicativo de nova espécie.

Estudos têm reportado que o sequenciamento do gene 16S rRNA resulta em variações intraespecíficas no gênero *Mycoplasma* como ocorre no *M. agalactiae* e *M. bovis*, contrariamente ao observado no grupo hominis, que apresenta pouco ou nenhum polimorfismo. Os ureaplasma de origem humana foram divididos em biovars I e II e subdivididos em 4 e 10 sorovares, respectivamente. Baseado na análise filogenética do gene 16S rRNA, espaço intergênico 16S-23S rRNA, subunidades do gene da urease e genes de antígenos de bandeamento múltiplos, o biovar I foi classificado como uma nova espécie denominada *U. parvum*. Para o gênero ureaplasma de ruminantes não há relato de variação intraespecífica no gene 16S rRNA. Em nosso estudo, os isolados de ovino e caprino agrupados às referências de *U. diversum* não nos permitem concluir que sejam da mesma espécie. A alta porcentagem de similaridades entre estes isolados e as cepas de referência de origem bovina assemelham-se aos dados obtidos pelo 16S rRNA dos biovars I e II do *U. urealyticum*, que por meio de análise de outros genes foi classificado como *U. parvum* (JOHANSSON; PETTERSSON, 2002).

6 CONCLUSÕES

- o material clínico, destinado ao cultivo e isolamento de ureaplasma, de muco vulvovaginal/sêmen das espécies caprina e ovina devem ser filtrados antes da inoculação em meio UB líquido e sólido;

- devem ser aprimorados os meios de cultivos destinados ao isolamento e diagnóstico dos micoplasmas de origem caprina e ovina, que neste trabalho cresceram em pH abaixo do requerido;

- isolamento de ureaplasma e micoplasma em amostras de muco vulvovaginal/sêmen das espécies caprina e ovina alerta sobre a necessidade de implantação de métodos de diagnósticos rotineiros e medidas de controle sanitários para estes agentes;

- a técnica da PFGE apresentou reprodutibilidade e poder discriminatório no estudo de variação genotípica em 50% dos isolados clínicos de ureaplasma de origem ovina;

- 50% dos isolados clínicos submetidos a PFGE não foram tipificados, indicando a limitação desta técnica para estes microrganismos;

- 60% dos isolados de ureaplasma de ovino e caprino apresentaram similaridade de 99,3% com o *Ureaplasma diversum* ATCC 49782 de origem bovina e para estabelecer sua classificação será necessário o sequenciamento de outros genes;

- 40% dos isolados clínicos de ureaplasma de ovinos não foram agrupados com outras espécies de origem humana e animal, quando utilizado o ponto de corte de 97%, podendo indicar uma nova espécie que futuramente deverá ser confirmada com a utilização do sequenciamento de outros genes;

- o isolado de micoplasma de ovino apresentou similaridade de 98% para *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma* sorogrupo 11, no gene 16S rRNA, não permitindo estabelecer a espécie.

REFERÊNCIAS

- AK, K.; AK, S.; GÜREL, A.; HASÖKSÜZ, M.; BARAN, A.; ÖZTÜRKLER, Y.; ILERI, I.K.; MINBAY, A. Experimental studies on the effects of *Mycoplasma agalactiae* on spermatological characters and genitals in rams. **Pendik. Vet. Mikrobiyol. Derg.**, v. 26, p. 2, 1995.
- ALFIZAH, H.; NORAZAH, A.; NORDIAH, A. J.; LIM, V. K. DNA fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in a teaching hospital in Malaysia. **Méd. J. Malaysia**, v. 57, n. 3, p.:319-328, 2002.
- ALVES, A. **Tipagem genética de microrganismos**, 2003, 24 p. Dissertação (mestrado em biologia molecular) - Centro de Biologia Celular, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2003.
- HENRIQUES, I.; SANTOS, A.; TACÃO, M.; CORREIA, A. ANUALPEC Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: Instituto FNP. 2005. 340 p.
- ARBEIT, R. D. Laboratory procedure for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**, 6th ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1995. p.190-208.
- AREERAMULU, P.; KRISHNASWAMY, S. Pathogenicity, and humoral and cell-mediated immune responses in experimental lambs with mycoplasmas. **Ind. J. Anim. Sci.**, v. 57, n. 8, p. 793-797, 1987.
- ASSIS, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; VIEIRA, L. S.; COSTA, C. T. C.; SOUZA, J. A. L. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 43-49, 2003.
- BALL, H. J.; MCCAUGHEY, W. J. Experimental production of vulvitis in ewes with a ureaplasma isolate. **The Veterinary Record**, v. 110, n. 19, p. 581, 1982.
- BALL, H. J.; MCCAUGHEY, W. J.; KENNEDY, S.; McLOUGHLIN, M. Experimental intrauterine inoculation of pregnant ewes with ureaplasmas. **Vet. Res. Com.**, v. 9, p. 35-43, 1985.
- BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: sophisticated reemerging and burdened by their notoriety. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, n. 1, p. 21-32, 1997.
- BERGEY'S Manual of determinative bacteriology. Michigan: Michigan State University, 2001. Disponível em: <<http://www.cme.msu.edu/bergeys>>. Acesso em: 14 mar. 2005.
- BINGEN, E. Applications of molecular methods to epidemiologic investigations of nosocomial infections in a pediatric hospital. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 15, p. 488- 493, 1994.

BLANC, D. S.; STRUELENS, M. J.; DEPLANO, A.; HAUSER, P. M.; PETIGNAT, C.; FRANCIOLI, P. Epidemiological validation of pulsed field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3442-3445, 2001b.

BLANCHARD, A.; BROWING, G. **Mycoplasmas: molecular biology pathogenicity and strategies for control**. Wymondham Norfolk, UK: Horizon Bioscience, 2005. 603 p.

BONIN, J. **Detecção de Mycoplasma pulmonis e Mycoplasma arthritidis no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

BUIM, M. R. **Mycoplasma synoviae: diagnóstico, caracterização molecular e interação parasita-hospedeiro**. 2005. 141p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005,.

BUZINHANI, M. **Detecção de micoplasma em fêmeas bovinas apresentando distúrbios reprodutivos por meio de cultura e reação em cadeia da polimerase**. 2001, 88 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BUZINHANI, M. **Identificação sorológica e diversidade genotípica das estirpes de Ureaplasma diversum isoladas do trato reprodutivo bovino**. 2006. 152 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

CARDOSO, M. V.; GREGORY, L.; TEIXEIRA, S. R.; SCARCELLI, E.; BRANDÃO, F. Z.; GENOVEZ, M. E. Alterações na qualidade seminal associadas à *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma diversum* em sêmen bovino "in natura". **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 25, n. 2, p. 240-242, 2001.

CARSON, J. L.; HU, P. C.; COLLIER, A. Cell structural and functional elements. In: MANILOFF, J. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992, p. 63-72.

COTTEW, G. S.; LLOYD, L. C.; PARSONSON, I. M. Isolation of mycoplasma from vulvovaginitis in sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, p. 576-577, 1974

DENT, C. H. R. Ulcerative vulvitis and posthitis in Australian sheep and cattle. **The Veterinary Bulletin**, v. 41, p. 719-723, 1971.

DI CASTRI, F.; YONES, T. Ecosystem function and biological diversity. **Biology International**, Paris, n. 22, p. 64-78, 1990. Special issue.

DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L. Isolation of ureaplasma from sheep with granular vulvitis. **The Veterinary Record**, v. 100, n. 26, p. 179-180, 1977.

DOIG, P. A.; RUHNKE, H. L.; MACKAY, A. L.; PALMER, N. C. Bovine granular vulvitis associated with Ureaplasma infection. **Can. Vet. J.**, v. 20, p. 89-94, 1979.

DUNN, K. Vulvitis and balanitis in a low land flock. **Proceedings of the sheep veterinary society**, v. 20, p. 41-42, 1996.

DUSSURGET, O.; DUSSOIX, D. R. Rapid, Sensitive PCR- Based Detection of Mycoplasmas in Stimulated Samples of Animal Soro. **Appl Environ Microbiol**, v. 60, p. 953- 959, 1994.

DYBVIG, K; VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 50, p. 25 - 27, 1996.

EMPARN. **Manejo sanitário de caprinos e ovinos**. Natal, RN: EMPARN, 2006. 32 p. (Circuito de tecnologias adaptadas para a agricultura familiar; v. 3).

FACKLAM, R; SAHM, D. A.; TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFLALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7 th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 297-305.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary *primers* to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 39, p. 729-735, 1995.

FAO. **FAOSTAT Database**. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 26 maio 2004.

FONSECA, J. F. **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. **Anais...** Palestras

FREY, J. Mycoplasmas of animals. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 73-90.

GARCIA, M.; JACKWOOD, M. W.; HEAD, M.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. H. Use of speceies-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* PCR amplication products. **J. Vet. Diag. Invest.**, v. 8, p. 53-56, 1996.

GARDELLA, R. S.; DEL GIUDICE, R. A. Hemagglutination, hemdsorption, and hemolysis. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in mycoplasmology**. New York: Academic Press, 1983, v.1, p. 379-390.

GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel electrophoresis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 14, p. 595-600, 1998.

GOLL JR, F. Identification of Mycoplasmas isolated from domestic animals. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Ed.).

Mycoplasmosis in Animals: Laboratory diagnosis. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1994, p.15-26.

GONZÁLEZ, Y. C.; ROS BASCUÑANA, C.; BÖLSKE, G.; MATTSSON, J. G.; MOLINA, C. F.; JOHANSSON, K. E. In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR. **Vet. Microbiol.**, v. 47; p. 183-190, 1995.

GOUVEIA, A. M. G. Aspectos Sanitários da Caprino-ovinocultura no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE O AGRONEGÓCIO DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA, 1., 2003, João Pessoa, PB. **Anais...** João Pessoa, PB: Emepa, 2003. p.115-131.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, J. B.; SALES, M. P. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos.** 1ª ed. Campos dos Goytacazes, 2006.

GREGORY, L.; METTIFOGO, E.; RIZZO, H.; CARDOSO, M. V.; BUZINHANI, M.; MENEGHINI, R. C. M.; TIMENESKI, J. Primeiro Isolamento de *Ureaplasma* sp em Sêmen e Swab Vaginal de Ovinos no Estado de São Paulo. In: CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Anais...** v. 1, p. 280.

HARTSTEIN, A. L.; CHETCHOTISAKD, P.; PHELPS, C. L.; LE MONTE, A. M. Typing of sequential bacterial isolates by pulsed-field gel electrophoresis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 309-314, 1999.

HEREMANN, R. Genome structure and organization. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Molecular biology and pathogenesis.** Washington: American Society of Microbiology, 1992. p. 157.

HOUSHAYMI, B. M.; MILES, R. J.; NICHOLAS, R. A. Oxidation of glycerol differentiates African from European isolates *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC (small colony). **Vet. Rec.**, v. 140, p. 182-183, 1997.

HOWARD, C. J.; GOURLEY, R. N.; COLLINS, J. Serological comparison between twenty-five bovine *Ureaplasma* (T-mycoplasma) strain by immunofluorescence. **Int. J. Bacteriol.**, v. 25, p. 155-159, 1975.

HOWARD, C. J.; POCOCK, D. H. Comparison of Ureaplasmas from sheep and goats with *Ureaplasma diversum* and *U. urealyticum*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 129, p. 3197-3202, 1983.

HOWARD, C. J.; POCOCK, D. H.; GOURLAY, R. N. Base composition of deoxyribonucleic acid from ureaplasmas isolated from various animal species. **Inter. J. of System Bacteriol.**, v. 28, p. 599-601, 1978.

IHEMELANDU, E. C. Ulcerative vulvitis in goats. **The Veterinary Record**, v. 91, n. 8, p. 197, 1972.

JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiol.**, v. 142, p. 1881-1893, 1996.

JASPER, D. E. Mycoplasma: their role in bovine disease. **J. Am. Vet. Ass.**, v. 151, p. 1650-1655, 1967.

JOHASSON, K-E.; PETTERSSON, B. Taxonomy of *Mollicutes*. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 1-29.

JONES, G. E.; RAE, A. G.; HOLMES, R. G.; LISTER, S. A.; JONES, J. M. W.; GRATER, G. S.; RICHARDS, N. Isolation of exotic mycoplasmas from sheep in England. **Vet. Rec.**, v. 3, p. 540, 1983.

JONES, G. E.; RAE, A. E.; Ureaplasma in sheep. *The Veterinary Record*. V. 104, n. 19, p. 466, 1979.

KAPOOR, S. G.; SINGH, P. P.; PATHAK, R. C. Prevalence of mycoplasma/acholeplasma in the genital tract of sheep. **Indian J. Animal Sci.**, v. 54, n. 7, p. 553-556, 1984.

KESWANI, K.; WHITMAN, W. B. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 667-678, 2001.

KIDANEMARIAM, A. **Identification and characterization of the primary infectious agents associated with ovine ulcerative balanoposthitis and vulvovaginitis in South Africa**. 2003, 125 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária – Microbiologia) – Faculdade de Ciências Veterinárias, Universidade de Pretoria, Pretoria, 2003.

KIRKBRIDE, C. A. Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.**, v. 3, p. 575-591, 1987.

KOELEMAN, J. G. M.; STOOF, J.; BIESMANS, D. J.; SVELKOU, P. H. M.; VANDENBROUKE-GRAULS, C. M. J. E. Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2522-2529, 1998.

KOTANI, H.; NAGATOMO, H.; OGATA, M. Isolation and serological comparison of ureaplasmas from goats and sheep. **Japanese J. Vet.**, v. 42, p. 31-40, 1980.

KREPLIN, C. M. A., RUHNKE, H. L.; MILLER, R. B.; DOIG, P. A. The effect intrauterine inoculation with *Ureaplasma diversum* on bovine fertility. **Can. J. Vet. Res.**, v. 51, p. 440-443, 1987.

LABARÈRE, J. DNA replication and repair. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 309-323.

LANGFORD, E. V. *Mycoplasma* species recovered from the reproductive tracts of western Canadian cows. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 39, p. 133-138, 1975.

LIVINGSTON JR., C. V.; GAUER, B. B. Isolation of T-strain mycoplasma from sheep and goats in Texas. **Am. J. Vet. Res.**, v. 36, n. 3, p. 313-314, 1975.

LIVINGSTON JR., C. W.; GAUER, B.B.; SHELTON, M. A specific Ureaplasma serotype associated with ovine uterine infections. **Am. J. Vet. Res.**, v. 39, n. 10, p. 1699-1701, 1978.

LIVINGSTON JR., C. W.; GAUER, B.B. Effect of venereal transmission of ovine ureaplasma on reproductive efficiency of ewes. **Am. J. Vet. Res.**, v. 43, n. 7, p. 1991-1993, 1982.

LIVINGSTON JR., C. V.; GAUER, B. B. Occurrence of *Mycoplasma* spp (2D) in Texas sheep flocks. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, n. 5, p. 868-869, 1983.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; TULLY, J. G.; WANG, R. Y. H; KOTANI, H.; PIERCE, P. F.; ROSE, D. L.; SHIH, J. K. *Mycoplasma penetrans* sp. nov. from urogenital tract of patients with AIDS. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 357-364, 1992.

LAUERMAN, L. H.; CHILINA, A. R.; CLOSSER, J. A.; JOHANSEM, D. Avian *Mycoplasma* Identification Using Polymerase Chain Reaction Amplicon and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Avian Diseases**, v. 39, p. 804-811, 1995.

LAUERMAN, L. H. *Mycoplasma* PCR Assays. In: **Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases**. Alabama, EUA: Dept. of Agriculture and Industries, 1998.

MAGALHAES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletrofoses em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n.2 p. 155-161, 2005.

MANILOFF, J. Evolution of wall-less prokaryotes. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 37, p. 477-499, 1983.

MANILOFF, J. Phylogeny and evolution. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 31-43.

MANILOFF, J. Phylogeny of mycoplasmas. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R.N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 549-559.

MAROIS, C.; DUFOUR-GESBERT, F.; KEMPH, I. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with random amplified polymorphic DNA for typing of *Mycoplasma synoviae*. **Vet. Microbiol.**, v. 79, p.1-9, 2001.

MARQUES, L. M. **Diagnóstico de micoplasma no trato respiratório anterior de bezerros por cultura e reação em cadeia da polimerase (PCR)**. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. Epidemiologic typing systems. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 17, p. 595-604, 1996.

MASLOW, J.; SLUTSKY, A. M.; ARBEIT, R. D. Application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. (Ed.). **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 563-572.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H. J. Ureaplasmas in sheep. **Vet. Rec.**, v. 105, n.22-29, p. 576-577, 1979.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H. J. Distribution of ureaplasmas in the urogenital tract of ewes. **The Veterinary Record**, v. 109, v. 21, p. 472, 1981.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H. J. Ureaplasmas in ewes. **Vet. Rec.**, v. 112, n.30. p. 441, 1983.

MCCAUGHEY, W. J.; BALL, H. J. The physical appearance of the vulva in ureaplasma infected ewes. **Vet. Res. Comm.**, v. 9, n. 2, p. 123-125, 1985.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 56, p. 21-28, 2000.

MELLO, N. T. C.; NOGUEIRA, E.; RODRIGUES, C. F. C. Entraves e desafios à caprinocultura no Sudeste paulista. Disponibilizado em < www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: 15 out. 2005.

MENARD, C.; BROUSSEAU, R.; MOUTON, C. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primer (AP-PCR) to strain identification of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.** V. 95, p. 163-168, 1992.

METTIFOGO, Elena. **Micoplasma de origem aviária :Diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase multiplex tipificação genômica com primers arbitrários e eletroforese de campo pulsado de cepas de Mycoplasma gallisepticum**. 2003. 194 p.Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MEUNIER, J. R.; GRIMONT, P. A. D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.**, v. 144, p. 373-379, 1993.

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PERREIRA, S. F.; KRISTINSSON, K. G.; WESTH, H.; JARLOV, J. O. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence geographic dissemination. **J. Clin. Microbiol.** V. 40, p. 430-438, 2002.

MILES, R. J. Cell nutrition and growth. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992, p. 23-40.

MILES, R. J.; NICHOLAS, R. Mycoplasma protocols: Introduction. **Methods Mol. Biol.**, v. 104, p. 01-05, 1998.

MILES, R. J.; TAYLOR, R. R.; ABV-GROUN, E. M.; ALIMOHAMMADI, A. Diversity of energy-yielding metabolism in *Mycoplasma* spp. **IOM Lett.**, v. 3, p. 165-166, 1994.

MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA, A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a University Hospital and Comparison with antibiotyping and protein A and Coagulase Gene Polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 6, p. 2119-2125, 2002.

MORETTI-BRANCHINI, M. L.; MORTHLAND, V. H.; TRESOLDI, A. T.; NOWAKONSKY, A. V.; DIAS, M. B. Application of genomic DNA subtyping by pulsed field gel electrophoresis and restriction enzyme analysis of plasmid DNA to characterize methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from two nosocomial outbreaks. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 17, p. 275-281, 1993.

MOROWITZ, H. J. Foreword: from the enigmatic pleuropneumonia-like organisms to the paradigmatic mycoplasma. In: RAZIN, S.; HERRMANN, R. (Ed.). **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 5-8.

MOSER, S. A.; MAYFIELD, C. A.; DUFFY, L. B.; WAITES, K. B. Genotypic characterization of *Ureaplasma* species by pulsed field gel electrophoresis. **J. Microbiol. Methods**, v. 67, p. 606-610, 2006.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci. Am.**, v. 262, p. 36-43, 1990.

- NASCIMENTO, E. R. Micoplasmose caprina e ovina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE. 2.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE O AGRONEGÓCIO DA CAPRINOCULTURA LEITEIRA, 1.; 2003, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, PB. Emepa, 2003. p 141- 151.
- NASCIMENTO, E. R.; NASCIMENTO, M. G. F.; FREUND, E. A.; ANDERSEN, H. Isolation of *Mycoplasmas mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. **Br. Vet. J.**, v. 142, p. 246-257, 1986.
- NEIMARK, H. C. Origins and evolution of wall-less prokaryotes. In: MADOFF, S. (Ed.). **The bacterial L-forms**. New York: Marcel Dekker Inc., 1986. p. 21-42.
- NICHOLAS, R. A. J.; WESSELS, M.; ORME, P. K.; WOOD, E.; SACHSE, K. Isolation of *Mycoplasma ovine*/caprine serogroup 11 from infertile sheep in Britain. **Vet Rec**, v. 9, p. 434, 1999.
- NICOLSON, G. L.; NASRALIA, M. Y.; NICOLSON, N. L. The patogenesis and treatment of mycoplasmal infectious. **Antimicrob Infect Dis Newsl**, v. 17, n. 11, p. 81-88, 1999.
- NOGUEIRA, E. A. E.; MELLO, N. T. C. Diagnóstico sócio econômico da caprinocultura paulista. **Informações Econômicas**, SP, v. 35,n. 8, 2005.
- NOGUEIRA, N.; CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S. **Boas práticas na produção de caprinos e ovinos de corte**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2005. 40 p.
- OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 1661-1669, 1999.
- OLSON, L. D.; RENSHAW, C. A.; ROTTEM, S.; BOAL, J. H. Arginine utilization by *Mycoplasma fermentans* is not regulated by glucose metabolismo ¹³C-NMR study. **FEMS Microbiol Lett**, v. 108, p. 47-52, 1993.
- RANA, J. S.; GUPTA, P. P.; BANGA, H. S. Pathology of genital tract of goats experimentally infected with *Mycoplasma* serogroup 11. **Ind. J. An. Sci.**, v.63, n. 7, p. 706-709, 1993.
- RAZIN, S. Cytadherence and the cytoskeleton. In: BALISH, M. F.; KRAUSE, D. C. **Mycoplasmas molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. Washington: American Society For Microbiology, 2002. p. 491-518.
- RAZIN, S. Molecular propertus of *Mollicutes*: a synopsis. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmology**. California: Academic Press, 1995. v. 1, p. 33-40.
- RAZIN, S. *Mycoplasma* Taxonomy and Ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 3-22.

RAZIN, S. Mycoplasmas: General concepsts. **Medical Microbiology**, 2004.
Disponível em: <<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch037.htm>>. Acesso em: 14 Mar. 2005

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiol Rev**, v. 42, p. 414-470, 1978.

RAZIN, S.; BARILE, M.F. Mycoplasma pathogenicity. In: RAZIN, S.; BARILE, M. F. (Ed.). **The mycoplasmas**. Orlando: Academic Press, 1985. v. 4, p. 161-202.

RAZIN, S.; HERRMANN, R. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 572 p.

RAZIN, S.; HYMAN, H. C.; WOGUE, D. DNA probes for detection and identification of mycoplasma (MOLLICUTES). **Israel Journal of Medical Science**, v. 23, p. 735-741, 1987.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Mycoplasma characterization**. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. *Methods in Mycoplasmaology*. New York: Academic Press, 1983. v. 1, 504 p.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Rev.**, v. 63, p. 1094-1156, 1998.

REID, S. W.; MADILL, D. G.; VREUGDENHIL, A. H. Ureaplasma vulvovaginitis and infertility in eighth southern Ontario dairy herds. **Can Vet J**, v. 30, p. 255, 1989.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. São Paulo: Nobel, 1997.

RIZZO, H. **Avaliação clínica e estudo da prevalência de fêmeas ovinas infectadas por micoplasmas na região de Piedade - SP - Avaliação da infecção sobre a produtividade do rebanho**. 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RODWELL, A. W.; PETERSON, J. E.; RODWELL, E. S. Macromolecular synthesis and growth of mycoplasmas. **Excerpta Med.**, p. 123-139, 1972.

ROTTEM S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 417-432, 2003.

RUHNKE, H. L.; ROSENDAL, S. Useful Protocols for Diagnosis of Animal Mycoplasmas. In: WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAUERMAN, L.H. (Ed.). **Mycoplasmosis in Animals: laboratory diagnosis**. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1994, p. 141-144.

RUHNKE, H. L.; DOIG, P. A. *Ureaplasma diversum* in bovine reproductive disease. In: STALHEIM, O. H. V. (Ed.). *Proceedings of an international Symposium on Microbiological tests for the international Wxchange of animal genetic material*. **American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**, Madison, WI, 1984, P.65-69

RUHNKE, H. L.; DOIG, P. A.; MACKAY, A. L. Isolation of *Ureaplasma* from bovine granular vulvitis. **Can. Vet. J.**, v. 42, p. 151-155, 1978.

SADER, H. S.; PIGNATARI, A. C.; HOLLIS, R. J.; JONES, R.N. Evaluation of interhospital spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in São Paulo using pulsed-field gel electrophoresis of chromosomal DNA. **Infect. Hosp. Epidemiol.**, v. 15, p. 320-323, 1994.

SAHU, S. P.; YEDLOUTSCHNIG, R. J. Contagious bovine peluropneumonia. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Ed.). **Mycoplasmosis in Animals: laboratory diagnosis**. Iowa: Iowa State University Press, Ames, 1994. p. 39-50.

SANDERSON, M. W.; CHENOWETH, P. J. The role of *Ureaplasma diversum* in bovine reproduction. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** v. 21, p. S98-S111, 1999.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467.

SAULNIER, P.; BOURNIEX, C.; PREVOST, G.; ANDREMONT, A. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminate than pulsed gel electrophoresis for typing strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 982-985, 1993.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. - Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 3, p. 67-75, 1984.

SHEPARD, M. C.; LUNCEFORD, C. D.; FORD, D. K.; PURCELL, R. H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; RAZIN, S.; BLACK, F. T. *Ureaplasma urealyticum* gen. nov. sp. nov.: proposed nomenclature for the human T (T-strain) mycoplasmas. **International J. Systematic Bacteriology**, v. 24, p. 160-171, 1974.

SILVA, E. R. da; VIEIRA, L. S.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; COSTA, A. L. da; CAVALCANTE, A. C. R. **Caprinos e ovinos: guia de saúde**. Sobral : Embrapa Caprinos, 2001. 66 p.

SIMPLÍCIO, A. A.; SIMPLÍCIO, K. M. M. G. Caprinocultura e ovinocultura de corte: desafios e oportunidades. **Revista CFMV**. Ano XII, n. 39, p. 7-18, 2006.

SIMECKA, J. W.; DAVIS, J. K.; DAVIDSON, M. K.; ROSS, S. E.; STÄDTLANDER, C. T. K-H.; CASSEL, G. H. *Mycoplasma* Diseases of Animals. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 03-22.

SINGH, N.; RAJYA, B. S.; MOHANTY, G. C. Granular vulvovaginitis (GVV) in goats associated with *Mycoplasma agalactiae*. **Conell. Vet.**, v. 64, n. 3, p. 435-442, 1974

STAHL, D. A. Molecular approaches for the measurement of density, diversity and phylogeny. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WATER, M. W. Manual of environmental microbiology. Washington: ASM Press, 1997, p. 102-114.

STAKENBORG, T.; VICCA, J. BUTAYE, P.; MAES, D.; PEETERS, J. KRUIF, A. HAESENBROUCK, F. Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed field gel electrophoresis. **Vet. Microbiol.**, v. 109, n. 1-2, p. 29-36, 2005.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **Int. J. Syst. Bact.**, Washington, v.44, p.846-849, 1994.

STIPKOVITS, L.; RÁDY, M.; GLÁVITS, R. Mycoplasmal arthritis and meningitis in calves. **Acta Vet. Hung.**, v. 41, n. 1-2, p. 73-88, 1993.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O.; FERREIRA, M.E.; RUMJANEK, N.G. Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro em condições tropicais: *Sinorhizobium*, um novo gênero nodulando eficientemente o feijoeiro em condições de stress térmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 19. 1997, Rio de Janeiro. **Abstracts...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997.

STRÜELEN, M. J.; SCHWAM, V.; DEPLANO, A.; BARAN, D. Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, p. 2320-2326, 1993.

STRUELENS, M. J.; RYCK, R.D.; DEPLANO, A. Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing. In: DIJKSHOORN L, TOWNER KJ, STRUELENS M, (ed.). **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**. London: Elsevier, 2001, 159-176.

TAMBIC, A.; POWER, E. G. M.; TAMBIC, T.; SNUR, I.; FRENCH, G. L. Epidemiological analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Zagreb Trauma Hospital using a randomly Amplified Polymorphic DNA- typing method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 335-340, 1999.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.; GOERING, R. V. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 18, n. 6, p. 426- 439, 1997.

TIMENETSKY, J. Micoplasmas: animais de laboratório (ratos e camundongos) e

culturas celulares. Livre Docência (Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004

TIMENETSKY, J.; METTIFOGO, E. **Micoplasmas**: características gerais e patogenicidade, 2002. Disponível em: <www.icb.usp.br/~bmm/mico>. Acesso em: 05 Fev. 2003.

TRICHARD, C. J. V.; JORDAAN, P.; PROZESKY, L.; JACOBSON, E. P.; HENTON, M. M. The identification of *Mycoplasma mycoides mycoides* LC as the aetiological agent of balanoposthitis and vulvovaginitis in sheep in South Africa. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, v. 60, p. 29-37, 1993.

TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Ed.). Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasma, San Diego, California: Academic Press, 1995. v.1, p. 33-40.

TULLY, J. G. Current status of the mollicute flora of humans. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. S2-S9, 1993.

VAN BELKUM, A.; VAN LEEUWEN, W.; KAUFMANN, M. E.; COOKSON, B.; FOREY, F.; ETIENNE, J. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I macrorestriction fragments: a multicenter study. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1653-1659, 1998.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN DER LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; UINT, W. G. V.; NIESTER, H. G. M.; GALAMA, J. M. D.; MELCHERS, W. J. G. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S RNA amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 8, p. 2606-2615, 1992.

VESSALIC, J.; WOODS JR, C. R.; GEORGHIOU, P. R.; HAMILL, R. J.; LUPSKI, J. R. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. **Arch. Pathol. Lab. Méd.**, v. 117, p. 1088-1098, 1993.

VIEIRA, L. S. **Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Sobral : Embrapa Caprinos, 2005. 32 p.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES, L. J. F. **Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1997. 50 p.

VILA, J.; MARCOS, M. A.; JIMENEZ DE ANTA, M. T. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. **J. Med. Microbiol.**, v. 44, p. 482-489, 1996.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WANG, J. T.; CHEN-CHUN, Y.; YANG, T. L.; CHANG, C. S. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. **Diag Microbiol and Infec. Dis.**, v. 42, p. 199-203, 2002.

WEBB, R. F.; CHICK, B. F. Balanitis and vulvo-vaginitis in sheep. **Australian Veterinary Journal**, V. 52, p. 241-242, 1976.

WEBER, S.; PFALLER, M.A.; HERWALDT, L.A. - Role the Molecular Epidemiology in Infection Control. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 11, p. 257-278, 1997.

WEISBURG, W. G.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; PETZEL, J. P.; OYAIZU, H.; YANG, D.; MANDELCO, L.; SECHREST, J.; LAWRENCE, T. G.; VAN ETEN, J.; MANILOFF, J.; WOESE, C. R. A phylogenetic analysis of the mycoplasma: basis for their classification. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 6455-6467, 1989.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WELSH, J.; PERUCHO, M.; PEINADO, M.; RALPH, D.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrarily primed PCR. In: McPherson, M. J.Ç HAMES, B. D.; TAYLOR, T. G. R. (Ed.). PCR 2: A practical approach. 1995. v. 1, p. 197-210.

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 18, n. 22, p. 6531- 6535, 1990.

YAMAGUTI, M. **Detecção do *Mycoplasma hyopneumoniae* pela reação em cadeia de polimerase em suínos com problemas respiratórios**. 2003, 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

YAMAMOTO, R.; KHAN, M. I.; ZHAO, S.; NASCIMENTO, E. R.; CHARLTON, B. Molecular methods used for detecting and fingerprinting pathogenic avian mycoplasmas. In: Poultry Mycoplasma workshop, Davis, C A: (Biotechnology), 1994. p. 1 - 19.

YOGEV, D.; ROSENGARTEN, R.; WATSON-MCKOWN, R.; WISE, K. S. Molecular basis of *Mycoplasma* surface antigenic variation: a novel set of divergent genes undergo spontaneous mutation of periodic coding region and 5' regulatory sequence. **Embo J.**, v. 10, p. 1069-1079, 1991.

ANEXO A – Meio de cultura SP4

Meios Líquido e Sólido - SP4 (TULLY, 1995)

- Triptona (Oxoid®).....10,0 gr.
- Peptona (Oxoid®).....5,3 gr.
- Mycoplasma Broth base (Becton Dickinson®) 3,5 gr.
- H₂O.....750 mL

O pH ajustado em 7,8.

Adicionar 10 gramas (gr.) de ágar purificado (Oxoid®) para o preparo do meio sólido.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos (min).

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

- Soro eqüino (Cultilab®).....180 mL
- CRML 1066 (Gibco®).....50 mL
- Extrato fresco de levedura 25%.....35 mL
- Glicose 10% (Merck®).....10 mL
- Arginina 10% (Merck®).....1 mL
- *Yeastolate* (Difco®).....10 mL
- Vermelho de Fenol 0,5% (Merck®).....4 mL
- Penicilina 100 000 U/mL (Sigma®).....1 mL
- Acetato de tálio 1% (Sigma®).....10 mL
- Anfotericina B..... 20 µl

Realizar o teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

ANEXO B – Meio de cultura UB

Meio Líquido UB (RUHNKE; ROSENDAL, 1994)

- PPLO (Difco®).....21,0 gr.
- H₂O deionizada.....630 mL

O pH ajustado em 5,5

Autoclavar a 121°C por 15 min.

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

- Soro eqüino (Invitrogen®).....200 mL
- Extrato fresco de levedura 25%.....100 mL
- Uréia 10% (Sigma®).....10 mL
- Penicilina 100 000 U/mL (Sigma®).....5 mL
- CRML 1066 (Gibco®).....50 mL
- L-cisteína 2% (Merck®).....10 mL
- Vermelho de Fenol 0,5% (Merck®).....4 mL
- Anfotericina B (Sigma®).....200 µL

Realizar o teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

Meio Sólido UB (RUHNKE; ROSENDAL, 1994)

- TSB (Difco®).....21,0 gr.
- H₂O deionizada.....600 mL
- Ágar (Noble-Oxoid®).....15,0 gr.

O pH ajustado em 5,5.

Autoclavar a 121°C por 15 min.

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

- Soro eqüino (® não inativado).....200 mL
- Extrato fresco de levedura 25%.....100 mL
- Uréia 10% (Sigma®).....10 mL
- Penicilina 100 000 U/mL (Sigma®).....5 mL
- MnSO₄ 3% (Merck®).....5 mL
- Vermelho de Fenol 0,5% (Merck®).....4 mL
- CRML 1066 (Gibco®).....50 mL
- Anfotericina B (Sigma®).....200 µL

Realizar o teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

ANEXO C – Método de extração

Extração de DNA (BOOM et al, 1990)

Tampão de lise:

Guanidine Isotyocianate.....	120 gr
Triton 100x.....	1 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	8,8 mL
Tris-HCL 0,1 M (pH 6,4).....	111,2 mL

Tampão de lavagem:

Guanidine Isotyocianate.....	120 gr
Tris-HCL 0,1M (pH 6,4).....	100 mL

Solução carreadora:

Diatomaceous earth.....	1gr
Água.....	5 mL
HCL 37%.....	50 µl