JULIANA BONIN FERREIRA

Detecção de *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritidis* no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR)

São Paulo
2005

JULIANA BONIN FERREIRA

Detecção de *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritidis* no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Dissertação 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 Mestre 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
2005

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1571
FMVZ

Ferreira, Juliana Bonin

Detecção de *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritidis* no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR) / Juliana Bonin Ferreira. – São Paulo : J. B. Ferreira, 2005.
92 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2005.

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. Isolamento animal. 2. *Mycoplasma pulmonis*. 3. Animais de laboratório. 4. Biotério. 5. Reação de cadeia por polimerase. I. Título.

ERRATA				
Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
13	1	5	94 f.	92 f.
15	1	5	94 f.	92 f.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091-7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 095/03, sobre o projeto intitulado **“Detecção de Mycoplasma pulmonis no trato respiratório superior de ratos e bioterista por cultura e reação em cadeia da polimerase”**, sob a responsabilidade de **Juliana Bonin Ferreira**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **13/10/2003**.

(We certify that the protocol nº 095/03, about **“Detection of Mycoplasma pulmonis on respiratory tract from rats and technicians by culture and polymerase chain reaction”** agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **13/10/2003** meeting.)

São Paulo, 15 de outubro de 2003.

Prof. Dra. Sonia Malheiros L. Sanioto
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender
Secretária da CEEA

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.011/2004

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 095/03/CEEA, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Deteccção de Mycoplasma pulmonis e Mycoplsma arthritidis no trato respiratório de roedores e bioteristas por cultura e reação em cadeia da polimerase*", sem modificações da espécie animal utilizada e métodos semelhantes.

São Paulo, 24 de novembro de 2004

Atenciosamente,

Profª. Dra. Maria Cerqueira L. Seelaender
Coordenadora da CEEA- ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 38130900 - telefax : (55) (11) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

São Paulo, 05 de fevereiro de 2004.

PARECER 545/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, em sua quadragésima segunda reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Detecção de *Mycoplasma pulmonis* no trato respiratório de ratos e bioteristas por cultura e reação em cadeia da Polimerase".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
JULIANA BONIN FERREIRA
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas-USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

Decl. CEP SH.054/2004

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 545/CEP, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Deteção de Mycoplasma pulmonis e Mycoplasma arthritidis no trato respiratório de roedores e bioteristas por cultura e reação em cadeia da polimerase*", sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 20 de agosto de 2004

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB /USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERREIRA, Juliana Bonin

Título: Detecção de *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritidis* no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Dissertação 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 Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais

Luciano e Célia,

Meus grandes exemplos de amor e trabalho,

Pois sem eles, não estaria onde estou.....

E a minha irmã Daniele.....

Pelos momentos de felicidade e por sua constante presença.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus novos e grandes amigos Nany, Lucas, Maurício e Melissa pela amizade, apoio e muita paciência.

And I am sure that they will encourage me forever and ever and ever. . . .

AGRADECIMENTOS

À Deus...

Aos animais de laboratório...

Ao meu orientador, Dr. Jorge Timenetsky, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento deste trabalho e pela constante compreensão.

A Celminha pela indispensável contribuição na execução deste trabalho e pela amizade conquistada. Muito obrigada.

Aos amigos do laboratório, Nany, Mau, Mel, Lucas, Marcos, Renata e Priscila, pela ajuda e companheirismo.

Ao Professor Silvio Arruda Vasconcellos, por estar sempre disposto a atender minhas solicitações.

Aos biotérios que gentilmente cederam seus animais para realização deste trabalho.

Ao Carlos, do biotério do ICB II, pela ajuda e disposição.

Aos funcionários da sala de esterilização do ICB II, pela enorme prestabilidade.

Ao funcionárias, Dayse, Claudia e Joana, da secretaria de Pós Graduação da FMVZ.

Aos funcionários do VPS.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia pelo auxílio prestado na preparação deste trabalho.

Às minhas grandes amigas, Fernanda, Camila e Natalia que sempre me apoiaram e que tenho certeza que jamais me abandonarão. Obrigada por tudo.

Aos meus familiares que sempre estiveram do meu lado, me apoiando e torcendo pelas minhas vitórias.

Ao Fabiano, pelo apoio, compreensão e paciência nos momentos de alegria e histeria.

A todos meus outros amigos aqui não mencionados, que às vezes com poucas palavras puderam me incentivar a percorrer e concluir esta etapa.

Agradeço de forma geral, porém não de forma menos importante, a todos os que foram realmente meus amigos durante o período de Mestrado.

“Estar no topo não quer dizer que você é o topo.”
Mestre Pon Chu Yen

RESUMO

FERREIRA, J. B. **Detecção de *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritidis* no trato respiratório superior de ratos e bioteristas por cultivo e reação em cadeia da polimerase (PCR).** [Detection of *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis* in the upper respiratory tract of rats and technicians by culture and polymerase chain reaction (PCR)]. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Mycoplasma pulmonis e *Mycoplasma arthritidis* são espécies frequentemente isoladas de animais de laboratório (ratos), causando prejuízos e alteração em resultados de pesquisa que utilizam tais animais. O *Mycoplasma pulmonis* coloniza principalmente o trato respiratório, nasofaringe e ouvido médio de murinos e causa micoplasmose respiratória murina (MRM). A principal via de transmissão é horizontal, o que facilita a disseminação deste agente para os demais ambientes do biotério e também para seus funcionários. O *Mycoplasma arthritidis* pode ser isolado da orofaringe destes animais, mas sua ocorrência natural é rara. Os micoplasmas geralmente são espécie-específicos embora algumas espécies possam ser encontradas em diferentes hospedeiros. O objetivo deste trabalho foi o isolamento *Mycoplasma pulmonis* e *Mycoplasma arthritidis* em ratos de laboratório e a detecção destas espécies por meio da PCR em ratos e funcionários de diferentes biotérios. Foram positivas para *Mycoplasma pulmonis* 144 (60%) amostras de lavado traqueal de ratos na cultura e 155 (64,58%) pela PCR espécie específica. *Mycoplasma arthritidis* não foi isolado e detectado em nenhuma amostra analisada. *M. pulmonis* foi detectado em quatro (10%) amostras de funcionários que não mantinham contato direto com os ratos, sendo uma do biotério 1 e três do biotério 4. Dos bioteristas que mantinham contato direto, 24 (77,4%) foram negativos nas duas coletas, 4 (12,9%) foram positivos após o manejo dos animais, 2 (6,5%) foram positivos em ambas as coletas e 1 (3,2%) foi positivo somente antes da higienização das caixas. Estes

resultados mostram que pessoas que trabalham em biotérios estão expostas a tal agente podendo servir como veículo de transmissão.

Palavras-chave: Isolamento. *Mycoplasma pulmonis*. Animais de laboratório. Bioteristas. Reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

FERREIRA, J. B. **Detection of *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis* in the upper respiratory tract of rats and technicians by culture and polymerase chain reaction (PCR).** [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. 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Mycoplasma pulmonis and *Mycoplasma arthritidis* are species usually isolated from laboratory rats, causing losses and modifying results of research that use such animals. *Mycoplasma pulmonis* inhabit primary the respiratory tract, nasopharynx, and middle ear of murines causing the murine respiratory mycoplasmosis (MRM). In general, aerosols perform the transmission, which allows the spreading of this agent to all facilities departments and to technicians. *Mycoplasma arthritidis* can be recovered from the oropharynx of these animals, but its occurrence is rare. Mycoplasmas usually exhibit a rather strict host and tissue specificity, probably reflecting their nutritionally exacting nature and obligate parasitic mode of life. However, there are numerous examples of the presence of mycoplasmas in hosts and tissue different from their normal habitats. The aim of this study was to recovery *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis* from laboratory rats and detection of these species by PCR in rats and technicians from distinct facilities. 144 (60%) samples of tracheal washed of rats were positives in culture to *Mycoplasma pulmonis* and 155 (64,58%) by specific PCR. *Mycoplasma arthritidis* was nor isolated, neither detected in any samples. *M. pulmonis* was detected in four (10%) of the samples collected from the technicians who did not maintain direct contact with rats, being one sample from facility 1 and three samples from facility 3. Regarding to technicians who keep direct contact, 24 (77,4%) were negatives on the two collects, 4 (12,9%) were positives after manipulating animals, 2 (6,5%) were positives in both collects, before

and after treatment of animals and 1 (3,2%) was positive before cleaning the boxes. These results showed that people who work in facilities are exposed to this agent and can become a reservoirs of infection.

Key words: Isolation. *Mycoplasma pulmonis*. Laboratory animals. Technicians. Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Colônias de *Mycoplasma pulmonis* em meio SP4, isoladas de amostra de lavado traqueal de ratos. Aumento de 100X 56
- Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando iniciadores MP1/MP2. Coluna 1: *Mycoplasma muris*; coluna 2: *M. neurolyticum*; coluna 3: *M. orale*; coluna 4: *M. buccale*; coluna 5: *M. arthritidis*; coluna 6: *M. pneumoniae*; coluna 7: *M. salivarium*; coluna 8: *M. hominis*; coluna 9: *Acholeplasma laidlawii*; coluna 10: *Ureaplasma diversum*; coluna 11: ácido nucléico humano; coluna 12: controle positivo *M. pulmonis*; coluna 13: controle negativo; coluna 14: peso molecular 100 pb 58
- Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando iniciadores ART1/ART2. Coluna 1: *Mycoplasma muris*; coluna 2: *M. neurolyticum*; coluna 3: *M. orale*; coluna 4: *M. buccale*; coluna 5: *M. arginini*; coluna 6: *M. pneumoniae*; coluna 7: *M. salivarium*; coluna 8: *M. hominis*; coluna 9: *Acholeplasma laidlawii*; coluna 10: *Ureaplasma diversum*; coluna 11: *M. fermentans*; coluna 12: *M. pulmonis*; coluna 13: ácido nucléico humano; coluna 14: controle negativo; coluna 15: controle positivo *M. arthritidis*; coluna 16: peso molecular 100 pb 58
- Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando iniciadores MP1/MP2 a partir do DNA de *M. pulmonis*. A avaliação da sensibilidade da técnica foi realizada por meio de diluições decimais de 1 µg até 1 atto DNA/µL; colunas 1 a 11: concentrações de 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 1 atto DNA/µL, respectivamente; coluna 12: controle negativo das reações com água ultrapura; coluna 13: padrão de peso molecular 100 pb 59
- Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando iniciadores ART1/ART2 a partir do DNA de *M. arthritidis*. A avaliação da sensibilidade da técnica foi realizada por meio de diluições decimais de 1 µg até 1 atto DNA/µL; colunas 1 a 11: concentrações de 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 1 atto DNA/µL, respectivamente; coluna 12: controle negativo das reações com água ultrapura; coluna 13: padrão de peso molecular 100 pb..... 59
- Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores MGSO/GPO3 a partir do DNA extraído de amostras de lavado traqueal de ratos. Coluna 1 a 16: amostras de lavado traqueal, amostras positivas 2 a 8 e 14; coluna 17: controle positivo *M. pulmonis*; coluna 18: controle negativo; coluna 19: peso molecular 100 pb 61
- Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando iniciadores MP1/MP2 a partir do DNA extraído de amostras de lavado traqueal de ratos. Coluna 1 a 13: amostras de lavado traqueal positivas; coluna 14: postivas *M. pulmonis*; coluna 15: controle negativo; coluna 16: peso molecular 100 pb 61
- Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando iniciadores MP1/MP2 a partir do DNA extraído de amostras de muco orofaríngeo de bioteristas. Coluna 1 a 13: amostras de muco orofaríngeo, amostras positivas 2, 4, 11 e 12; coluna 14: controle positivo *M. pulmonis*; coluna 15: controle negativo; coluna 16: peso molecular 100 pb 64

Figura 9 - Sequência de nucleotídeo do produto amplificado do *M. pulmonis*. Alinhamento da sequência do gene 16S rRNA (Genbank pelo número [AF125582](#)) com a sequência de nucleotídeos amplificada da amostra de bioterista positiva para *M. pulmonis* utilizando o programa BLASTn (2005) 65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de microrganismos da Classe dos <i>Mollicutes</i> , seqüências e tamanho do produto amplificado	48
Quadro 2 -	Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de <i>M. pulmonis</i> , seqüências e tamanho do produto amplificado.....	49
Quadro 3 -	Oligonucleotídeos iniciadores específicos para <i>M. arthritidis</i> , seqüências e tamanho do produto amplificado.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados dos cultivos para micoplasma a partir de amostras de lavado traqueal.....	56
Tabela 2 -	Número e porcentagem de detecção de micoplasmas pela PCR genérica e espécie-específica a partir do DNA extraído de amostras de lavado traqueal de ratos	60
Tabela 3 -	Reações positivas e negativas na PCR para a detecção de micoplasmas a partir de DNA extraído de amostras da orofaringe de bioteristas	63
Tabela 4 -	Fator associado ao risco de contaminação dos bioteristas por <i>M. pulmonis</i>	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Mollicutes	25
2.2	Animais de laboratório	28
2.3	Micoplasma em ratos e camundongos	29
2.3.1	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	30
2.3.2	<i>Mycoplasma arthritidis</i>	37
2.4	Interferência nos resultado das pesquisas biomédicas	40
2.5	Especificidade dos micoplasmas aos hospedeiros	41
3	OBJETIVOS	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Cepas de referência	44
4.2	Subcultivo das amostras de referência	44
4.2.1	Meios de cultivo para micoplasma	45
4.3	Coleta de amostras de lavado traqueal de ratos	46
4.4	Coleta de amostras de muco da orofaringe dos bioteristas	46
4.5	Cultivo e isolamento	47
4.6	Extração do DNA	47
4.7	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	48
4.7.1	PCR genérica	48
4.7.2	PCR com iniciadores específicos para <i>M. pulmonis</i>	49
4.7.3	PCR com iniciadores específicos para <i>M. arthritidis</i>	50
4.7.4	Detecção do produto amplificado	51
4.8	Especificidade e sensibilidade da PCR	52
4.9	Seqüenciamento dos produtos obtidos na PCR específica	52
4.10	Análise estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Cultivo das amostras de lavado traqueal	55
5.2	Teste de especificidade e sensibilidade da PCR espécie-específica	57
5.3	Detecção de micoplasmas em amostras de lavado traqueal por meio da PCR genérica e espécie-específicas	60
5.4	Pesquisa de <i>M. pulmonis</i> e <i>M. arthritidis</i> em amostras de muco orofaríngeo de bioteristas por meio da PCR espécie-específica .	62
5.5	Análise do seqüenciamento	65
5.6	Estimativa do risco relativo e razão de chance	66
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Os micoplasmas são os menores e mais simples procariontes auto-replicantes, possuindo limitada organização celular para o seu crescimento e multiplicação: membrana citoplasmática, DNA e ribossomos. Diferente de outros procariontes, os micoplasmas não possuem parede celular. A biologia celular deste microrganismo é interessante não somente para micoplasmologistas, mas também para pesquisadores que utilizam os micoplasmas como modelo no estudo dos mecanismos biológicos em geral, particularmente os relacionados às estruturas e funções de membrana. Um consenso entre microbiologistas, relacionado à classificação dos micoplasmas, concluiu que estes microrganismos, com exceção do *Thermoplasma*, uma arqueobactéria, constituem um grupo filogeneticamente distinto de bactérias que está fracamente relacionado às eubactérias (RAZIN, 1978).

Os micoplasmas de origem animal podem ser classificados como “parasitas de membrana”, pois se aderem firmemente a esta estrutura e colonizam as regiões de mucosa dos animais. Estes microrganismos parasitam seus hospedeiros usualmente sem matá-los, causando freqüentemente, infecções crônicas de difícil erradicação (RAZIN, 1978).

O *Mycoplasma pulmonis* coloniza principalmente o trato respiratório, nasofaringe e ouvido médio de murinos (DAVIDSON et al., 1981) e causa a micoplasmose respiratória murina (MRM). Esta afecção é a mais importante nestes animais e altera resultados de experimentos que utilizam ratos e/ou camundongos (KOHN; BARTHOLD, 1984). Em um estudo realizado em 1996 verificou-se que a presença desta espécie persistia em quase todos os biotérios da cidade de São

Paulo e que cerca de 10^5 micoplasmas/mL eram detectados no lavado traqueal de ratos (TIMENETSKY; DE LUCCA, 1998).

O *Mycoplasma arthritidis* também é encontrado em colônias de ratos causando poliartrite, no entanto, a infecção natural é rara e quando ocorre dificilmente apresenta sinais clínicos (COLE et al., 1985; CASSELL et al., 1986).

Não existe nenhum dado da literatura quanto ao monitoramento de *M. pulmonis* e *M. arthritidis* nos bioteristas, principalmente aqueles que estão em contato direto com os ratos envolvidos na higienização das caixas. Utilizando-se das proteínas totais de *M. pulmonis*, verificou-se que indivíduos com mais de sete anos de trabalho em biotérios possuíam um perfil imunoeletroforético semelhante ao dos ratos infectados e diferente das pessoas com menos tempo de serviço ou que nunca estiveram em biotérios (DELGADO; TIMENETSKY, 2001).

No sentido de ampliar as informações no contexto do monitoramento microbiológico do biotério de produção de animais para experimentação, foi realizada neste estudo, pela PCR e cultivo, a detecção de *M. pulmonis* e *M. arthritidis* em ratos. O monitoramento dos bioteristas foi incluído neste estudo dada a inevitável exposição destes profissionais aos animais infectados durante os procedimentos de higienização. A microbiota residente da orofaringe humana é muito ampla, incluindo-se a diversidade de micoplasmas, o que dificulta o isolamento de micoplasmas desta região. Deste modo, a PCR é uma metodologia bastante favorável à detecção espécie-específica destes agentes.

Com o aprimoramento das técnicas biomoleculares, a detecção de *M. pulmonis* e *M. arthritidis* pela reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR) pode ser aplicada nos animais e humanos. A metodologia é sensível e pertinente na detecção de micoplasmas (VEILLEUX et al., 1996).

Considerando que o *M. pulmonis* é indesejável aos biotérios e pesquisa, seu controle deve ser aprimorado. Deste modo, boas praticas de laboratório como desenvolvimento e monitoramento permanente de agente indesejáveis são necessárias para se evitar medidas mais drásticas no controle de qualidade dos animais como o sacrifício das colônias infectadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mollicutes

O primeiro isolamento de micoplasmas foi descrito em 1898, por Edmond Nocard e Emile Roux que estudavam a pleuropneumonia bovina, cujo agente etiológico era filtrável, assim como os vírus que haviam sido recentemente descobertos, entretanto, eram cultivados em meio de cultura como a maioria das bactérias. Este agente ficou conhecido como *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Microrganismos semelhantes, isolados de animais e humanos, foram descritos por outros pesquisadores e denominados de PPLO – *Pleuropneumonia-Like Organisms* (MOROWITZ, 2002; RAZIN, 1992).

O termo micoplasma é utilizado informalmente para designar os membros da Classe dos *Mollicutes*, composta por cinco ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeapasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incetae sedis*), seis famílias (*Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeapasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* e *Erysipelothricaceae*) e 14 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelotrix*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*) (BERGEY'S, 2001)

Os micoplasmas são considerados os menores microrganismos de vida livre e com ausência de parede celular. Esta estrutura desapareceu por um processo de evolução degenerativa (NEIMARK, 1986; RAZIN; TULLY, 1983). A falta de parede celular torna estas bactérias resistentes aos antimicrobianos que atuam na síntese

de parede celular como os beta-lactâmicos. (MCCORMACK, 1993; WAITES et al., 2003). Os micoplasmas, em geral, aproximam-se às dimensões dos maiores vírus (0,2 a 0,4 μm) e sua morfologia geralmente é ovóide. Poucas espécies, entretanto, atingem cerca de 100 μm ou apresentam-se espiraladas (BASEMAN; TULLY, 1997).

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

Apesar de não possuírem flagelos, algumas espécies encontradas em mamíferos exibem deslizamento sobre superfícies líquidas ou apresentam contração celular como alguns apresentados em plantas. Algumas espécies de micoplasma como *Mycoplasma amphoriforme*, *M. gallisepticum*, *M. pulmonis*, *M. penetrans*, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. alvi*, *M. sualvi* e *M. mobile* possuem estrutura ou prolongamento polar em sua superfície, que concentram proteínas interdependentes, conferindo adesão dos micoplasmas às células hospedeiras (CARSON et al., 1992; RAZIN, 1992). Estas estruturas, em algumas espécies, podem estar envolvidas na invasão de células hospedeiras, processo descoberto inicialmente em *Mycoplasma penetrans* de origem humana (LO et al., 1992).

Os micoplasmas podem adquirir nutrientes das células hospedeiras para seu crescimento, por meio de contato direto com a superfície celular, entretanto, substâncias como gordura, colesterol e precursores de ácido nucléico não são prontamente difundidos a superfície, deste modo, o micoplasma precisa manter uma íntima associação com a membrana celular a fim de adquiri-los (CASSELL et al., 1986).

Os *Mollicutes* são divididos basicamente em fermentadores e não fermentadores. Os fermentadores produzem ácidos por meio de metabolização da glicose e outros carboidratos diminuindo o pH do meio de cultivo. Os não fermentadores possuem a via da arginina desidrolase como modo de obter ATP, aumentando o pH (RAZIN, 1978; 2004). Ambas as vias podem ser utilizadas por alguns micoplasmas. A glicólise ocorre inicialmente e os ácidos produzidos podem mascarar a alcalinização do meio de cultura devido a hidrólise da arginina (OLSON et al., 1993). Alguns micoplasmas, sob condições aeróbicas, oxidam glicose, piruvato e lactato em acetato e dióxido de carbono, e podem ter o metabolismo de L-arginina resultando em ornitina. As vias metabólicas variam entre as espécies, havendo algumas ainda desconhecidas (MILES et al., 1994). Os ureaplasmas necessitam de uréia (único entre os organismos vivos) para produzir ATP, hidrolizando este composto e produzindo amônia (BASEMAN; TULLY, 1997; RAZIN, 2004).

O genoma dos *Mollicutes* é o menor conhecido entre os procariotos, o que pode indicar desenvolvimento por evolução degenerativa, redutiva ou regressiva acompanhada por perda significativa de sequência genômica (DYBVIK; VOELKER, 1996; MANILOFF, 1996). A evolução dos *Mollicutes* tem por base hipóteses, entretanto, Razin et al. (1998) enfatizam que estes microrganismos são produtos de uma evolução tardia.

Esta classe bacteriana pode ser dividida em dois grupos de acordo com o tamanho do genoma, um composto pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, que possui cerca de 500 a 1300 Kpb, e outro formado pelos gêneros *Acholeplasma*, *Spiroplasma* e *Anaeroplasma* que apresentam um genoma de aproximadamente 1350 a 1700 Kpb. Os genomas são caracterizados por possuírem baixo conteúdo de guanina e citosina (C + G), variando de 24 a 33 mol%, com exceção de algumas

espécies. A determinação do conteúdo de DNA tem sido incluída entre os testes para a definição de novas espécies de *Mollicutes* (RAZIN, 1992).

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 do trato respiratório, genital, orofaríngeo, oftálmico bem como a glândula mamária e articulação (RAZIN, 1992; RAZIN, 1995) e geralmente causam infecção inaparente e persistente (ROSENBUSCH, 1994).

Nos roedores, muitas espécies de micoplasmas foram isoladas e consideradas comensais devido a incapacidade destes agentes em produzir a doença, gerando apenas infecção silenciosa. Estas, não só apresentam problemas no diagnóstico presuntivo, mas também interagem com a fisiologia do hospedeiro induzindo a súbitas mudanças na resposta biológica, influenciando os estudos em diferentes áreas (CASSELL et al., 1979; DAVIDSON et al., 1994).

2.2 Animais de laboratório

Os roedores destinados a experimentação possuem classificações sanitárias de acordo com a microbiota residente e as condições de barreiras sanitárias dos biotérios. Segundo National Research Council (NRC, 1991a) esta classificação diferencia os animais em padrões distintos:

- axênicos ou *germ-free* - livres de microrganismos e mantidos nas melhores condições de barreiras sanitárias;

- *Virus Antibody Free* (VAF) – ausência de anticorpos contra vírus;
- gnotobióticos - microbiota associada e definida;
- *Specific Pathogen Free* (SPF) ou heteroxênicos - livres de uma determinada lista de microrganismos considerados patogênicos aos animais;
- convencionais - com algumas barreiras e monitoramento para alguns agentes patogênicos;
- haloxênicos (indefinidos) - sistema aberto e sem monitoramento laboratorial.

O biotério que produz ratos e camundongos direcionados à pesquisa deve registrar e apresentar laudos de monitoramento sanitários e os animais destinados a reposição necessitam certificação prévia (BAKER et al., 1980; DE LUCCA et al., 1996; GILIOLI, 2003).

2.3 Micoplasma em ratos e camundongos

As infecções encontradas em ratos e camundongos geralmente são causadas por *Mycoplasma pulmonis*, *M. arthritidis* e *M. neurolyticum* sendo encontrados também o *M. collis* e *M. muris*. O *M. pulmonis* foi conhecido como o agente causal de doença respiratória tanto em ratos como em camundongos, e por volta de 1970, foi responsabilizado também por doença genital. O *M. arthritidis* foi descrito pela primeira vez em 1938 como patógeno de roedores. O *M. neurolyticum* parece ser comum em biotérios convencionais, mas ainda é pouco estudado. Este agente foi ocasionalmente isolado de ratos e camundongos e considerado somente uma vez como patógeno natural (CASSELL et al., 1986; DAVIDSON et al., 1994; TULLY, 1986).

M. pulmonis e *M. arthritidis*, assim como outros micoplasmas, são patógenos extracelulares e seu potencial patogênico tem origem na interação membrana-membrana das superfícies das células eucarióticas, particularmente as células que revestem a superfície mucosa. O *M. pulmonis* possui estrutura polar *bleb* ou *tip structure*, sendo capaz de aderir-se a várias células (CASSEL et al, 1981b).

2.3.1 *Mycoplasma pulmonis*

Em 1937, Nelson descreveu uma doença que denominou “catarro infeccioso” em camundongos e atribuiu a forma cocobaciliformes, no mesmo ano Klieneberger e Steabben descreveram esta enfermidade como broncoestase pulmonar em ratos. Em 1957, Nelson usou o termo “doença crônica respiratória” e sugeriu que a ocorrência estava associada a dois agentes, *M. pulmonis* (catarro infeccioso) e vírus enzoótico (doença broncopulmonar) (NRC, 1991b). Trabalhos realizados anos depois (1969) concluíram que o *M. pulmonis* reproduzia todas as características clínicas e patológicas da doença natural quando inoculados em ratos SPF, sendo *M. pulmonis* identificado como o único causador da Micoplasmose Respiratória Murina (MRM) (KOHN; KIRK, 1969; LINDSEY et al., 1971; NRC, 1991b; WHITTLESTONE et al., 1972).

M. pulmonis é o agente etiológico da MRM que causa doença respiratória e genital em ratos e camundongos (TULLY, 1986). Dentre os patógenos que acometem ratos de laboratório, o *M. pulmonis* é a espécie de maior na validação dos resultados de experimentação animal (BAKER, 1998; KOHN; BARTHOLD, 1984). A

MRM é considerada uma importante referência na compreensão das micoplasmoses respiratórias humana e animal (DAVIDSON et al., 1981; LINDSEY et al., 1985).

O trato respiratório é a principal porta de entrada da MRM. A colonização inicia-se geralmente na cavidade nasal seguido pelo ouvido médio, laringe, traquéia e pulmão (DAVIDSON et al., 1981; LINDSEY et al., 1985). A infecção em ratos jovens geralmente é subclínica, nos mais velhos, são observados sinais clínicos inespecíficos como coriza seguida de secreção mucopurulenta oculonasal. Espirros, dispnéia, balançar de cabeça, fricção de face e orelha, pelagem desarrumada, bruxismo, perda de peso, movimentos circulares quando erguidos pela cauda devido a labirintite, diminuição no número de crias e eficiência reprodutiva, são classificados como sinais clínicos tardios (CASSELL, 1982; CASSELL et al., 1979; KOHN; BARTHOLD, 1984; LINDSEY et al., 1971; NRC, 1991b; SCHUNK et al., 1995). Nos animais adultos ou velhos, a doença é mais severa, provavelmente devido a ineficiência da resposta imune e conseqüente progressão da enfermidade, podendo ocorrer envolvimento pulmonar (CASSELL et al., 1979; JERSEY et al., 1973). As manifestações clínicas mais freqüentes como rinite, otite média, laringite, traqueíte, bronquite, alveolite apresentam caráter agudo ou crônico (DAVIDSON et al., 1994). Abscessos pulmonares e/ou hepatização pulmonar podem ocorrer, entretanto, raramente as lesões evoluem para pleurite e enfisema (SIMECKA et al., 1992). Ocasionalmente, animais infectados podem apresentar uma zona vermelha ao redor dos olhos e narinas devido a excessiva secreção de porfirina pela glândula lacrimal, diferente do exsudato serosanguinolento, não sendo um sinal patognomônico (CASSELL et al., 1979).

Rinite purulenta e otite média parecem ser as lesões macroscópicas mais comuns em ratos infectados por *M. pulmonis*, entretanto, podem ser observadas na ausência de outras lesões (CASSELL et al., 1979).

A característica mais evidente da MRM é a presença de lesões em intensidades diferentes nos animais da mesma idade, mesma colônia ou mesma gaiola (CASSELL et al., 1986; JERSEY et al., 1973).

Microscopicamente, a resposta inflamatória é caracterizada por infiltrado de células linfocíticas na submucosa e neutrofílica no lúmen da cavidade nasal, ouvido médio e árvore traqueobrônquica (KOHN e BARTHOLD, 1984).

A doença pode levar a uma hiperplasia epitelial e/ou metaplasia escamosa da mucosa nasal e traqueal, com redução no número de cílios, devido a utilização pelo micoplasma de componentes da célula do hospedeiro e/ou pela liberação de metabólitos tóxicos como peróxido de hidrogênio (LINDSEY et al., 1971).

Lesões no trato respiratório inferior são mais comuns em ratos com quatro semanas de idade, podendo apresentar hiperplasia do tecido bronquial, broncoestase, broncopneumonia e bronquiolite supurativa, hiperplasia epitelial com infiltrado de células mononucleares na submucosa, peribronquial e perivascularmente, alveolite não supurativa a supurativa, atelectasia e pseudoglândulas peribronquiais (CASSELL et al., 1979; DAVIS; CASSELL, 1982; JERSEY et al., 1973; KOHN; BARTHOLD, 1984; LINDSEY et al., 1971; NRC, 1991b; SCHOEB; LINDSEY, 1987).

O pulmão da maioria dos mamíferos saudáveis, assim como dos ratos, têm menor quantidade de linfócitos na submucosa bronquial, particularmente na bifurcação ou entre os brônquios e vasos sanguíneos adjacentes. O tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) está presente nos pulmões de todos os ratos, indiferente da idade e microbiota residente. A proliferação do BALT é uma das primeiras e mais evidentes alterações microscópicas após a infecção nos pulmões por *M. pulmonis*. Os linfócitos podem aumentar até duas vezes mais em pulmões infectados quando comparado a um normal. Associada a proliferação do BALT na

MRM está o aumento na produção de mucina e acúmulo de polimorfonucleados no lúmen bronquial (CASSELL et al., 1979).

A transmissão pode ser horizontal, não havendo relação entre idade e sexo com a resistência. O aerossol gerado por espirro de animal doente pode infectar outro até 120 cm de distância (KOHN; BARTHOLD, 1984). A resistência entre linhagens de animais é pouco conhecida, no entanto algumas apresentam maior suscetibilidade a MRM do que outras. A transmissão vertical também pode ocorrer, sendo na maioria das vezes pós-parto por contato direto, entretanto se o trato genital estiver infectado pode acontecer a infecção pré-natal (CARTNER et al., 1996; CARTNER et al., 1995; CASSELL et al., 1986; DAVIS; CASSELL, 1982; KOHN; BARTHOLD, 1984; LANE-PETER et al., 1970; NRC, 1991b;). As fêmeas podem adquirir infecção uterina no começo da vida, em alguns casos antes do coito, existem evidências que a cria pode infectar-se com o *M. pulmonis in utero* (TRAM et al., 1970). A disseminação do microrganismo do trato respiratório para o útero pode ocorrer via hematogênica (CASSELL et al., 1979).

A MRM é uma doença respiratória crônica progressiva, de início precoce podendo persistir por toda a vida do animal. Deste modo, os animais provavelmente tornam-se reservatório da infecção, transmitindo o microrganismo pelo ar entre gaiolas e ratos que estejam no mesmo ambiente (BELL; WHEELER, 1970; JERSEY et al., 1973). A separação dos animais em gaiolas específicas (tipo caixa de sapato) (CASSELL et al., 1979), ou por distância (BELL; WHEELER, 1970) reduz o nível de transmissão e retarda o desenvolvimento da doença.

A capacidade do micoplasma de se manter viável por muitos dias na água de beber, ração, fezes ou outro material e serem fontes de infecção é uma contradição entre os pesquisadores (CASSELL et al., 1979). Outros animais podem servir como

reservatório da infecção. O *M. pulmonis* já foi isolado de ratos selvagens (HILL, 1974), coelho (DEEB; KENNY, 1967), hamster e cobaio (TULLY, 1986).

Existe alta prevalência da infecção por *M. pulmonis* tanto em biotérios convencionais como em animais SPF. Este agente foi isolado de todas as colônias convencionais e em mais de 66% dos biotérios com barreiras (CASSELL, et al., 1981a). O *M. pulmonis* foi obtido por cultura em um terço das populações de ratos e camundongos de colônias mantidas com barreiras sanitárias (LINDSEY, 1986).

Aerossóis gerados por animais doentes ou infectados e o contato direto são as principais vias de transmissão do *M. pulmonis*. A rapidez com que este agente é transmitido depende de fatores ambientais como ventilação, grau de recirculação do ar, densidade populacional e concentração de amônia (KOHN; BARTHOLD, 1984; NRC, 1991b). Estudos foram confirmados por Lindsey e Conner (1978) comparando os efeitos da frequência da sanitização das gaiolas (flutuação cíclica de amônia na gaiola) na progressão da MRM.

O ambiente interno das gaiolas de ratos de laboratório possui amônia, devido a ação bacteriana nos resíduos orgânicos da cama suja. Broderon et al. (1976) demonstraram que a concentração de amônia aumenta a severidade dos sinais clínicos da MRM.

A patogenia da MRM pode ser influenciada por outros fatores, como sugerem alguns autores. O aumento de dióxido de carbono de um sistema deficiente de ventilação pode ocasionar um surto de MRM e a inalação de agentes químicos pode acelerar o processo de desenvolvimento da doença (LANE-PETER et al., 1970; LINDSEY et al., 1985; PINSON et al., 1988; SCHOEB et al., 1982).

Outros agentes microbianos podem estar envolvidos com a progressão da doença. Infecções intercorrentes com vírus Sendai, coronavírus, bactérias oportunistas e possíveis bacilos associados ao epitélio ciliar respiratório (*cilia-*

associated respiratory (CAR) *bacillus* - bactérias Gram negativas, filamentosas que causam doença respiratória crônica em roedores de laboratório) podem influenciar significativamente a ocorrência da doença (CASSELL et al., 1986; MACKENZIE et al., 1989; NRC, 1991b).

Algumas deficiências nutricionais (vitaminas A e E) (TVEDTEN et al., 1973), a administração de hexametilfosfamida ou ciclofosfamida e inalação de fumaça de cigarro predis põem os ratos a infecções por *M. pulmonis* (NRC, 1991b).

A presença de *M. pulmonis* no trato genitourinário de murinos causa Micoplasmose Genital Murina que pode estar associada a doença respiratória (KOHN; BARTHOLD, 1984). Geralmente a enfermidade é crônica e ocorre de 30% a 40% das fêmeas de uma colônia (GRAHAM, 1963), podendo provocar 50% de queda na fertilidade em colônias infectadas. Similar a doença respiratória, o trato genital apresenta-se macroscopicamente normal, entretanto pode estar comprometido microscopicamente (CASSELL et al., 1986).

Lesões macroscópicas estão limitadas a aproximadamente 30% das fêmeas infectadas, sendo as mais comuns ooforite unilateral purulenta e salpingite. O útero não apresenta muitas alterações, exceto a presença de fetos subdesenvolvidos e parcialmente reabsorvidos. Microscopicamente, pode-se observar um exsudato neutrofílico no lúmen do oviduto com hiperplasia do epitélio linear e infiltração linfóide na submucosa, as lesões como metrite podem evoluir para uma piometra e endometrite. Mudanças no epitélio incluem hiperplasia, metaplasia das células escamosas e formação de pólipos (CASSELL et al., 1986; CASSELL et al., 1979). Segundo Cassell et al. (1986) machos infectados podem apresentar epididimite e uretrite por *M. pulmonis* isolados dos vasos deferentes. Infecção natural no trato genital em camundongos é incomum, embora experimentalmente o agente possa levar a uma infertilidade.

As infecções respiratória e genital são crônicas e progressivas com equilíbrio delicado entre o agente e hospedeiro, o que geralmente favorece a instalação do agente (CASSELL et al., 1979).

A prevenção da MRM em biotérios ou colônias de experimentação ocorre por meio da utilização de sistemas de barreiras que dificultam a entrada de *M. pulmonis* nos laboratórios (KOHN; BARTHOLD, 1984).

A eliminação do *M. pulmonis* de colônias com infecção clínica e subclínica é difícil, entretanto, algumas medidas podem ser eficientes. A derivação cesariana é um meio de estabelecer colônias de criação livre de *M. pulmonis*. Devido a freqüente localização deste microrganismo no útero, é necessário assegurar que neonatos nascidos por derivação cesariana não tenham sido infectados no útero (KOHN; BARTHOLD, 1984; NRC, 1991b).

O controle de fatores ambientais que favorecem a MRM como freqüência de sanitização das caixas, diminuição da densidade populacional e concentração de amônia e prevenção de infecções concomitantes podem ser úteis na prevenção da doença clínica ou diminuição nos surtos. O uso de antibióticos como tetraciclina pode ser útil para controlar os sinais clínicos, no entanto, estas drogas não têm capacidade curativa (BRODERSON et al., 1976; LINDSEY; CONNER, 1978; NRC, 1991b). A combinação entre controle ambiental e imunização pode ser relevante para a proteção dos animais contra a infecção. Até o momento, a maioria dos métodos para o controle da micoplasmose mostrou-se ineficiente, no entanto a vacinação tem apresentado resultados promissores. A vacinação de reprodutores e matrizes pode contribuir para a manutenção da colônia. A imunização, com antígeno inativado, em biotérios com barreiras poderia levar a erradicação da doença, uma vez que não proporcionaria os efeitos negativos de uma vacina viva, onde a condição de animal SPF poderia ser descaracterizada para a pesquisa biomédica

(ARAUJO et al., 2003). Deve-se levar em consideração que a relação entre a doença do trato respiratório e genital é pouco relatada (CASSELL et al., 1979). Deste modo, pouco se sabe se a vacina protege simultaneamente na colonização do trato respiratório e genital. Ratos e camundongos são protegidos por vacina contra o desenvolvimento de doença respiratória após infecção experimental (CASSELL et al., 1986).

Alguns pesquisadores afirmam ter sucesso (geralmente temporário) em eliminar a MRM de uma colônia de criação com programas rígidos de seleção (INNES et al., 1957), associado a administração de drogas (GIDDENS et al., 1971) ou derivação cesariana combinada com procedimento de isolamento estrito (KAPPEL et al., 1969; 1974).

2.3.2 *Mycoplasma arthritidis*

A infecção natural por *M. arthritidis* em ratos foi pouco relatada desde 1938. Os trabalhos mais importantes iniciaram-se em 1969 (NRC, 1991b). Este microrganismo está relacionado a infecção experimental em nasofaringe, pulmão, abscessos ovarianos, glândula submaxilar e/ou múltiplos órgãos (NRC, 1991b).

O agente pode colonizar faringe, ouvido médio e pulmão dos ratos, embora poucos estudos relatem sua frequência em colônias de criação. Ratos e camundongos são considerados hospedeiros naturais deste agente. O microrganismo pode ser isolado da passagem nasal, conjuntiva, útero e por lavado traqueal (NRC, 1991b). O *M. arthritidis* pode se manter em “estado latente” nas articulações ou pode residir normalmente na microbiota do trato respiratório e

ocasionalmente ser introduzido nas articulações causando doença articular esporádica ou epizootica (WARD; COLE, 1970).

No trato respiratório, a colonização por *M. arthritidis* induz a lesões pouco relevantes, e já foi relatado que este agente coexiste com *M. pulmonis* (KOHN; BARTHOLD, 1984). Embora o *M. arthritidis* seja considerado o agente principal envolvido na artrite dos ratos, a doença raramente é relatada (KOHN; BARTHOLD, 1984; CASSELL et al., 1979) sendo menos freqüente que o *M. pulmonis*, que também pode levar a artrite (CASSELL et al., 1979). A doença não é transmitida pelo contato direto entre animais saudáveis e infectados. Ward e Cole (1970) observaram maior prevalência para *M. arthritidis* em ratos que apresentavam injúrias nos pés, devido a manutenção destes animais em gaiolas inapropriadas. As abrasões na extremidade dos membros estão envolvidas na entrada do agente nas articulações por disseminação hematogênica ou por extensão de tecidos adjacentes (KOHN; BARTHOLD, 1984; WARD; COLE, 1970).

Evidências sugerem que a infecção subclínica ocorre em ratos e camundongos, incluindo aqueles nascidos por derivação cesariana e criados em biotérios com barreiras, geralmente sem lesões aparentes (NRC, 1991b). A doença natural ocorre mais freqüentemente em ratos jovens (oito a 93 dias) sem relação com o sexo do animal (CASSELL et al., 1979).

Animais com artrite apresentam claudicação e dificuldade na movimentação devido a dor associada à poliartrite. As articulações dos membros e das vértebras podem estar acometidas, sendo as mais freqüentemente envolvidas as tibiotársicas e radiocárpicas, podendo ocorrer comprometimento de mais de uma delas. Os tecidos articulares e periarticulares apresentam hiperemia, tumefação e exsudato purulento (KOHN; BARTHOLD, 1984).

A inoculação experimental intravenosa com *M. arthritidis* induz a eritema, tumefação e limitação dos movimentos das articulações por três a sete dias, podendo ocorrer a cura ou progressão para anquilose das estruturas afetadas. A maioria das deformidades nos ossos longos parece ser causada pela formação de um novo periósteo. Embora o envolvimento dos ossos seja a principal manifestação da infecção, conjuntivite, uretrite e pielonefrite podem ocorrer (CASSELL et al., 1979).

Microscopicamente, há exsudação de neutrófilos nos espaços sinoviais e infiltrado de linfócitos e células plasmáticas na membrana sinovial. Após a resposta inflamatória acentuada ocorre destruição da cartilagem articular, podendo evoluir para sinovite e proliferação periostal. Inflamação perineural e edema podem comprimir a raiz do nervo no forame espinhal levando a paralisia flácida dos membros posteriores. Caso o nervo não seja completamente destruído, a paralisia regride, pois a artrite é auto-limitante. A poliartrite está associada a outras infecções bacterianas e o diagnóstico de artrite induzida por *M. arthritidis*, só pode ser concluído com o isolamento (KOHN; BARTHOLD, 1984). Alguns animais podem apresentar infecção subclínica e o agente pode estar em diferentes sítios, o que dificulta o isolamento. Nos raros casos de artrite clínica, o exsudato da articulação pode ser utilizado no isolamento do agente (NRC, 1991b).

A cultura de micoplasmas de colônia de ratos ou camundongos pode ser realizada por *swab* da orofaringe ou do ducto nasofaríngeo, lavado traqueal e do ouvido médio e macerado de pulmão dos animais e, tanto *M. pulmonis* como *M. arthritidis* podem ser isolados destes materiais, mesmo na ausência da doença (CASSELL et al., 1979; DAVIDSON, et al., 1981; LAI et al., 1986; STEWART; BUCK, 1975; THOMSON; HILL, 1972).

O monitoramento da sanidade das colônias de roedores é realizada por meio de diagnóstico sorológico (ELISA) e a diferenciação das cepas de *M. pulmonis* ou *M. arthritidis* por immunoblotting ou técnicas moleculares (PCR) (NRC, 1991b; KIM et al., 2005). Medidas como controle dos tipos de instalação, ambientais, manejo, reposição ou aquisição de novos animais devem ser realizadas de acordo com as boas práticas de bioterismo (CARDOSO, [entre 1998-2001]).

2.4 Interferência nos resultado das pesquisas biomédicas

A presença de micoplasmas em animais de laboratório e culturas celulares destinadas a pesquisa biomédica podem interferir na interpretação dos resultados da pesquisa biomédica. Adicionalmente ocorre o prejuízo econômico na produção destes animais (CASSELL et al., 1986; KOHN; BARTHOLD, 1984; LINDSEY et al., 1971). Ratos infectados por *M. pulmonis* podem interferir nos resultados de estudos imunológicos, de doenças respiratórias, de cultivo celular, gerontológicos, toxicológicos, carcinogênicos, nutricionais, comportamentais, de funções ciliares, de cinética celular dos tecidos do trato respiratório, de desenvolvimento da inflamação neurogênica, de atividade de células NK, patofisiológicos e reprodutivos (CASSELL et al., 1986; CASSELL et al., 1979; HICKMAN, 1986; KOHN; BARTHOLD, 1984; LINDSEY et al., 1971). As infecções crônicas causadas por este agente pode interferir também nos experimentos prolongados (BAKER, 1998; KOHN; BARTHOLD, 1984; NRC, 1991b).

Infecções subclínicas por *M. arthritidis* podem complicar a artrite experimental causada por outros agentes e induzir poliartrite espontânea em ratos. Tumores

transplantáveis em ratos podem ser contaminados por este agente resultando em artrite e/ou abscessos no local da inoculação, em camundongos podem induzir a produção de interferon, ativação de linfócito T e B, supressão da resposta imune celular e humoral e alteração da função dos macrófagos (CASSELL et al., 1986; CASSELL et al., 1979; HICKMAN, 1986; NRC, 1991b).

2.5 Especificidade dos micoplasmas aos hospedeiros

Os micoplasmas apresentam alta especificidade quanto aos tecidos dos hospedeiros. A presença natural ou experimental de espécies de micoplasmas em hospedeiros e tecidos não usuais, inclusive de micoplasmas animais em humanos, já foi descrita (RAZIN, 1992). Espécies consideradas de origem animal foram esporadicamente encontradas no homem como comensais ou provocando doença (ROTTEM, 2003).

A transposição da barreira natural da especificidade do micoplasma ao hospedeiro tem sido descrita mais frequentemente entre os animais do que no homem. Algumas espécies animais podem abrigar micoplasmas não usuais sem desenvolver doenças, porém pouco se conhece sobre o desenvolvimento destas micoplasmoses entre animais. Em humanos, verificou-se que os estados de imunossupressão quase sempre estão associados a infecções não usuais por espécies de micoplasmas, sejam eles de origem animal ou humana (MORTON, 1970; TULLY, 1996).

M. pulmonis já foi isolado em gatos (OGATA, 1983) e cavalos (WHITFORD; LINGSWEILER, 1994) e *M. salivarium*, micoplasma bucal humano, foi detectado em secreções nasais e faringeanas de suíno (ERICKSON et al., 1988). *M. arthritidis*

(roedores) foi isolado do líquido sinovial de suínos (BINDER et al., 1990) macaco e também do homem (NRC, 1991b), *M. canis* (canino) foi isolado de bezerros (TER LAAK, 1993). Alguns micoplasmas humanos como *M. pneumoniae* e *M. hominis* infectam experimentalmente ratos e macacos (BARILE et al., 1990; FURR; TAYLOR-ROBINSON, 1989; FURR et al., 1989).

Madoff et al. (1979) isolaram *M. bovis* (bovino) de um paciente com pneumonia severa, que apresentou contato direto com bovino algumas semanas antes da internação hospitalar. A paciente apresentava altos títulos para anticorpos contra *M. pneumoniae*, o que sugere uma infecção pelos dois agentes. A presença de *Acholeplasma laidlawii* é comumente descrita em humanos, no entanto, o *Acholeplasma oculi*, espécie reportada em caprinos, foi isolada do líquido amniótico humano (WAITES et al., 1987). McCabe et al. (1987) descreveram uma infecção por micoplasma não identificado na mão de um veterinário, provavelmente adquirido após a mordida de um gato, causando destruição tecidual e leve celulite. Foi descrita a infecção fatal em um paciente de 64 anos, imunossuprimido (linfoma não – Hodgkin), por *M. arginini*, geralmente presente em animais de produção. Esta pessoa trabalhava em matadouro e o agente provavelmente foi adquirido nestas instalações (YECHOURON et al., 1992). *M. felis*, (felinos) foi isolado do líquido sinovial de um caso de artrite séptica em paciente com hipogamaglobulinemia e submetida a terapia com corticóides (BONILLA et al., 1997). O micoplasma encontrado em focas (*M. phocacerabole*), foi isolado do ferimento na mão de um tratador e do dente do animal agressor. No local da injúria a pessoa queixava-se de dor, inchaço e eritemas, sugerindo sintomas de uma doença conhecida por “dedo de foca” (*seal finger*), cujo agente etiológico ainda desconhecido (BAKER et al., 1998).

3 OBJETIVOS

Cultivo e isolamento de micoplasmas do trato respiratório de ratos de biotérios aparentemente saudáveis.

Deteção dos gêneros pertencentes à classe *Mollicutes* do trato respiratório de ratos aparentemente saudáveis utilizando a PCR genérica.

Otimização da técnica da PCR específica para deteção de *M. pulmonis* e *M. arthritidis* do lavado traqueal de ratos e orofaringe de bioteristas.

Comparação dos resultados obtidos utilizando-se das técnicas de cultivo e PCR.

Verificar se o contato direto entre bioteristas e ratos é um fator de risco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas de referência

Mycoplasma pulmonis PG34, *M. arthritidis* PG6, *M. arginini* G-230, *M. fermentans* PG18, *M. orale* CH19299, *M. buccale* CH2O247, *M. penetrans* GTU54, *M. hominis* PG21, *M. salivarium* PG20, *M. pirum* 70-159, *M. genitalium* G37, *M. pneumoniae* FH, *M. muris* RIII4, *M. neurolyticum* Type A, *Acholeplasma laidlawii* PG38 e *Ureaplasma diversum* ATCC 449783. As bactérias foram obtidas da coleção do Laboratório de Micoplasmas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

4.2 Subcultivo das amostras de referência

As amostras de referências de micoplasmas, estocadas previamente em caldo SP4 e glicerol a – 20°C, foram subcultivadas em 2mL de meio SP4 líquido e sólido e incubadas a 37°C em aerofilia por aproximadamente 15 dias.

4.2.1 Meios de cultivo para micoplasma

Meio Líquido/Sólido SP4 (TULLY, 1995)

- Triptona (Oxoid[®]).....10,0 g
- Peptona (Oxoid[®]).....5,3 g
- Mycoplasma Broth Base (Becton Dickinson[®]).....3,5 g
- Água (H₂O) destilada.....750 mL

pH 7,8;

Adicionar 10 gramas (g) de ágar purificado (Oxoid[®]) para o preparo do meio sólido;

Autoclavar a 121°C por 20 minutos (min.);

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

- Soro eqüino (Cultilab[®]).....180 mL
- CRML (Gibco[®]).....50 mL
- Extrato fresco de levedura 25%.....35 mL
- Glicose 10% (Merck[®]).....10 mL
- Arginina (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

Teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

4.3 Coleta de amostras de lavado traqueal de ratos

Foram estudadas 240 amostras clínicas de lavado traqueal de ratos (*Rattus norvegicus*: raça Wistar) aparentemente saudáveis pertencentes a oito biotérios convencionais da cidade de São Paulo.

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e fixados em decúbito dorsal, para a obtenção do material clínico. A anti-sepsia foi realizada na região do pescoço com álcool 70°, seguida de incisão utilizando tesoura e bisturi cirúrgicos estéreis para rebater pele e músculos. As glândulas submaxilares e linfonodos foram removidos para exposição da traquéia. A seringa foi preparada com 1 mL do meio SP4 (TULLY, 1995) e agulha estéril (30 x 8 mm), que foi inserida na luz traqueal para realização da lavagem por três vezes consecutivas. O material obtido foi submetido à análise.

4.4 Coleta de amostras de muco da orofaringe de bioteristas

Foram coletadas amostras clínicas de 71 bioteristas, pertencentes a oito biotérios convencionais da cidade de São Paulo.

Amostras de muco orofaríngeo foram coletadas com auxílio de *swabs* (CLYDE, 1983), acondicionados em meio líquido SP4 e mantidos sob refrigeração. Os bioteristas com acesso direto às salas de manipulação dos ratos foram submetidos a duas coletas, realizada antes da entrada e após a saída (31

funcionários). Os funcionários que não mantinham contato direto com os animais foram submetidos a uma coleta (40 funcionários).

4.5 Cultivo e isolamento

O cultivo das amostras de lavado traqueal dos ratos foi realizado em caldo SP4 (TULLY, 1995). Alíquota de 200 μL de amostra clínica de ratos foi inoculada em meio SP4 líquido, obtendo a diluição de 10^{-1} , e 100 μL dessa diluição foi semeado em meio SP4 sólido. Os meios foram incubados a 37°C em aerofilia, e observados por 15 dias consecutivos. A identificação presuntiva foi realizada com base na fermentação da glicose e hidrólise da arginina, visualizadas pela mudança de cor do indicador de pH (vermelho de fenol) do meio líquido, e observação de colônias em forma de “ovo frito” no meio sólido. As culturas puras dos isolados foram obtidas, por meio de três repiques consecutivos de uma colônia isolada, e a confirmação dos isolados foi realizada por métodos moleculares (PCR). Não foi realizado o cultivo das amostras clínicas dos humanos

4.6 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada pelo método de fervura, descrito por Fan et al. (1995), utilizando-se 1 mL das amostras de lavado traqueal de ratos e 1 mL de muco orofaríngeo de humanos. As amostras foram centrifugadas a 17760 $\times g$ por 10

min. (centrífuga refrigerada). Foram realizados duas lavagens do sedimento com 100µl de tampão PBS (2,6 mM NaH₂PO₄, 7,4 mM NaHPO₄, 10 mM NaCl, pH 7,2) seguido de centrifugações. Após a última lavagem, o sedimento obtido foi ressuspensionado em 20 µl de tampão PBS, colocado em “banho maria” a 100°C por 10 min. e imediatamente após em gelo por 5 min. Após este procedimento foi realizado centrifugação a 17760 xg durante 10 min. e o sobrenadante, contendo o DNA, foi acondicionado em microtubo e estocado a - 20°C até a sua utilização.

4.7 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

4.7.1 PCR genérica

Os oligonucleotídeos iniciadores genéricos (Quadro 1) utilizados são complementares a seqüências conservadas do gene 16S do rRNA dos gêneros pertencentes à Classe dos *Mollicutes* descrito por Van Kuppeveld et al. (1992). A PCR foi realizada com o DNA das amostras de lavado traqueal dos ratos como triagem.

Quadro 1- Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de microrganismos da Classe dos *Mollicutes*, seqüências e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Seqüências	Produto
MGSO	5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3'	270 pb
GPO3	5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3'	

A reação foi preparada para a obtenção do volume de 50 µl contendo: 5 µl de tampão para a PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 8 µl de solução de deoxiribonucleotídeos (1 mM do Mix de dNTP's), 2,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,8 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (40 pmol), 1,0 µl de DNA cromossomal e 0,2 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Invitrogen™). A amplificação foi estabelecida como descrita por Van Kuppeveld et al. (1992): 1 ciclo de 5 min. a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos (s.) a 94°C, 30 s. a 55°C e 30 s. a 72°C e 1 ciclo final de 10 min. a 72°C. Após a amplificação os produtos foram mantidas a 4°C até o momento da eletroforese. Não foi realizado a PCR Genérica para as amostras coletadas de bioteristas.

4.7.2 PCR com iniciadores específicos para *M. pulmonis*

Os oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 2) são complementares à seqüência do gene 16S do rRNA específico para *M. pulmonis*, descrito por Van Kuppeveld et al. (1992). A PCR foi realizada com as amostras clínicas positivas de ratos na PCR genérica. Todas as amostras de humanos coletadas foram submetidas para *M. pulmonis*

Quadro 2- Oligonucleotídeos iniciadores específicos para detecção de *M. pulmonis*, seqüências e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Seqüências	Produto
MP1	5'- AGC GTT TGC TTC ACT TTG AA-3'	266pb
MP2	5'- GGG CAT TTC CTC CCT AAG CT-3'	

A reação foi preparada para a obtenção do volume de 50 µl contendo: 5 µl de tampão para a PCR (KCl 500 mM, Tris 200mM em pH 8,4); 3 µl de solução de deoxiribonucleotídeos (1 mM do Mix de dNTP's), 2,5 µl de MgCl₂ (1,5 mM), 1 µl de cada oligonucleotídeos iniciadores (40 pmol), 1,0 µl de DNA cromossomal e 0,2 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Invitrogen™). A amplificação foi estabelecida de acordo com Van Kuppeveld et al. (1992): 1 ciclo de 5 min. a 94°C, 40 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 62°C e 1 min. a 72°C e 1 ciclo final de 5 min. a 72°C. Após a amplificação os produtos foram mantidos a 4°C até o momento da eletroforese.

4.7.3 PCR com iniciadores específicos para *M. arthritidis*

Os oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 3) são complementares à sequência do gene 16S do rRNA específico do, descrito por Van Kuppeveld et al. (1992). A PCR foi realizada com as amostras clínicas positivas de ratos na PCR genérica. Todas as amostras de humanos coletadas foram submetidas para *M. arthritidis*.

Quadro 3- Oligonucleotídeos iniciadores específicos para *M. arthritidis*, seqüências e tamanho do produto amplificado

Iniciadores	Seqüências	Produto
ART1	5'- CCT CAA AGC TCC ACT AGA GG-3'	265pb
ART2	5'- AGC ATT TCC TCA ACT AAG TG-3'	

A reação foi preparada para a obtenção do volume de 50 µl contendo: 5 µl de tampão para a PCR (KCl 500 mM, Tris 200 mM em pH 8,4); 3 µl de solução de deoxiribonucleotídeos (1 mM do Mix de dNTP's), 1,5 µl de MgCl₂ (1,5mM), 1 µl de cada oligonucleotídeos iniciadores (40 pmol), 1,0 µl de DNA cromossomal e 0,2 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Invitrogen™). A amplificação dos iniciadores foi estabelecida de acordo com Van Kuppeveld *et al.* (1992): 1 ciclo de 5 min. a 94°C, 40 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 62°C e 1 min. a 72°C e 1 ciclo final de 10 min. a 72°C. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até o momento da eletroforese.

4.7.4 Detecção do produto amplificado

Os produtos obtidos pelas PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo em tampão tris-acetato-EDTA (TAE). A visualização e fotodocumentação dos produtos foram feitas sob luz ultravioleta, no aparelho Vilber Lourmat®. O marcador de peso molecular utilizado foi 100 pb DNA Ladder (Invitrogen™).

4. 8 Especificidade e sensibilidade da PCR

O teste de sensibilidade foi realizado para *M. pulmonis* e *M. arthritidis*. Foi necessário 20 mL de cultura de cada microrganismo. O DNA foi obtido pelo método de fervura e quantificado pelo espectrofotômetro Beckman DU-600, utilizando-se do comprimento de onda (absorbância) de 260nm. A seguir, foram realizadas diluições decimais do DNA extraído em água ultrapura estéril, partindo de 1µg até 1atto DNA/µl. A cada diluição, as amostras foram fervidas durante um minuto e homogeneizadas, para evitar a formação de grumos de DNA (SAMBROOK et al., 1989).

A especificidade foi avaliada por meio de amplificações com DNA das espécies descritas no item 4.1 e com ácido nucléico humano extraído de cultura celular. Para cada amplificação foram utilizados controle positivo com a cepa *M. pulmonis* e *M. arthritidis* e controle negativo com água ultrapura estéril.

4.9 Seqüenciamento dos produtos obtidos pela PCR específica

Foram seqüenciadas quatro amostras: cepa de referência, lavado traqueal de rato e duas de orofaringe de bioteristas. A purificação foi realizada utilizando-se 90 µl do produto amplificado pelos iniciadores MP1 e MP2 específico para *M. pulmonis*, precipitados com acetato de sódio 3M (10% do volume do produto) e isopropanol 100% (60% do volume do produto) e incubados *overnight* a 4°C. Após este período, a solução

foi centrifugada a 20598 xg por 10 min. e o sedimento ressuspendido em 45 µl de tampão TE.

Cada reação foi realizada com somente um dos iniciadores. Para a realização do seqüenciamento foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 5 pmol (1 µl) de iniciador (MP1 ou MP2), 2 µl de Big Dye Terminator, 2 µl de Tampão Save Money 2.5X, 3 µl do DNA precipitado e água ultrapura até o volume final de 10 µl. O termociclador foi programado para 1 ciclo de 96°C durante 1 min., e 30 ciclos de 96°C durante 15 s., 62°C durante 15 s., 60°C durante 4 min., utilizando rampa de 1°C/s.

Após a amplificação, o produto foi precipitado adicionando 30 µl de água ultrapura e 60 µl de isopropanol 100%. A solução foi homogeneizada por 1 s. e centrifugada a 20598 xg por 15 min. a 22°C. O sobrenadante foi descartado e adicionado 150 µl de isopropanol 65% e centrifugado a 20598 xg por 10 min. a 22°C. E após esse procedimento o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi mantido em temperatura ambiente e protegido da luz para secagem. Este produto foi mantido em freezer até a corrida do seqüenciamento.

As amostras foram ressuspendidas em 10 µl de Formamida Hi-Di, homogeneizadas, denaturadas no termociclador a 95°C por 2 min., resfriadas em gelo por 1 min. e aplicadas no ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Os protocolos foram descritos segundo Applied Biosystems. O pareamento das seqüências foi realizado por meio do programa BLAST (2005).

4.10 Análise estatística

A amostragem estudada foi calculada com prevalência de 80% com nível de segurança de 95% por meio da tabela de cálculo do tamanho aproximado da amostra requerida para estimar a prevalência em grandes populações com limites de confiança fixo.

Foram realizadas estimativa de risco e a razão de chance na amostragem de bioteristas para *M. pulmonis* para avaliar a associação entre contato direto ou indireto ao agente e a presença de caso. A análise de associação entre os grupos foi testada pelo teste de quiquadrado (χ^2) com significância estatística se $P \leq 0,05$ (GORDIS, 2004).

5 RESULTADOS

5.1 Cultivo das amostras de lavado traqueal

Foram isolados *Mycoplasma pulmonis* em 144 amostras (60%) provenientes de animais de diferentes biotérios (Figura 1). Os cultivos positivos de *M. pulmonis* apresentaram acidificação do meio de cultura, sem turvação, e produção de colônias típicas. Das 240 amostras coletadas 80 (33,33%) foram negativas no cultivo para micoplasma e 16 (6,67%) contaminaram com outros microrganismos (Tabela 1). Não foi isolado *M. arthritidis* em nenhuma amostra coletada.

Tabela 1 – Resultados dos cultivos para micoplasma a partir de amostras de lavado traqueal

Biotérios	Animais	Cultura		
		Positiva	Negativa	Contaminadas
B1	31	2 (6,45%)	25 (80,65%)	4 (12,90%)
B2	26	23 (88,46%)	1 (3,85%)	2 (7,69%)
B3	30	29 (96,67%)	1 (3,33%)	0
B4	30	30 (100%)	0	0
B5	31	31 (100%)	0	0
B6	32	0	27 (84,37%)	5 (15,63%)
B7	30	0	26 (86,67%)	4 (13,33%)
B8	30	29 (96,67%)	0	1 (3,33%)
Total	240	144 (60%)	80 (33,33%)	16 (6,67%)

Figura 1- Colônias de *Mycoplasma pulmonis* em meio SP4, isoladas de amostra de lavado traqueal de ratos. Aumento de 100X

5.2 Teste de especificidade e sensibilidade da PCR espécie-específica

No teste de especificidade, não houve reações cruzadas com outras espécies de micoplasma e com ácido nucléico humano, detectando-se apenas o produto esperado (266 pb) com o DNA da cepa *M. pulmonis* (Figura 2) e o produto de 265 pb com o DNA da cepa *M. arthritidis* (Figura 3).

A figura 4 apresenta as reações positivas da PCR com diluições de até 10^{-9} da solução de DNA do *M. pulmonis*, correspondendo à sensibilidade máxima de aproximadamente 1 fg de DNA/ μ L. A figura 5 apresenta a sensibilidade da PCR de aproximadamente de 10 pg de DNA/ μ L (diluição de 10^{-5}) do *M. arthritidis*.

Figura 2- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando iniciadores MP1/MP2. Coluna 1: *Mycoplasma muris*; coluna 2: *M. neurolyticum*; coluna 3: *M. orale*; coluna 4: *M. buccale*; coluna 5: *M. arthritidis*; coluna 6: *M. pneumoniae*; coluna 7: *M. salivarium*; coluna 8: *M. hominis*; coluna 9: *Acholeplasma laidlawii*; coluna 10: *Ureaplasma diversum*; coluna 11: ácido nucléico humano; coluna 12: controle positivo *M. pulmonis*; coluna 13: controle negativo; coluna 14: peso molecular 100 pb

Figura 3- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando iniciadores ART1/ART2. Coluna 1: *Mycoplasma muris*; coluna 2: *M. neurolyticum*; coluna 3: *M. orale*; coluna 4: *M. buccale*; coluna 5: *M. arginini*; coluna 6: *M. pneumoniae*; coluna 7: *M. salivarium*; coluna 8: *M. hominis*; coluna 9: *Acholeplasma laidlawii*; coluna 10: *Ureaplasma diversum*; coluna 11: *M. fermentans*; coluna 12: *M. pulmonis*; coluna 13: ácido nucléico humano; coluna 14: controle negativo; coluna 15: controle positivo *M. arthritidis*; coluna 16: peso molecular 100 pb

Figura 4- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando iniciadores MP1/MP2 a partir do DNA de *M. pulmonis*. A avaliação da sensibilidade da técnica foi realizada por meio de diluições decimais de 1 μ g até 1 atto DNA/ μ L; colunas 1 a 11: concentrações de 1 μ g, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 1 atto DNA/ μ L, respectivamente; coluna 12: controle negativo das reações com água ultrapura; coluna 13: padrão de peso molecular 100 pb

Figura 5- Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR utilizando iniciadores ART1/ART2 a partir do DNA de *M. arthritidis*. A avaliação da sensibilidade da técnica foi realizada por meio de diluições decimais de 1 μ g até 1 atto DNA/ μ L; colunas 1 a 11: concentrações de 1 μ g, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg e 1 atto DNA/ μ L, respectivamente; coluna 12: controle negativo das reações com água ultrapura; coluna 13: padrão de peso molecular 100 pb

5.3 Detecção de micoplasmas em amostras de lavado traqueal por meio da PCR genérica e espécie-específicas

Na PCR genérica (Figura 6), observaram-se reações positivas em 171 amostras clínicas de ratos (71,25%). Entre estas, *M. pulmonis* foi detectado, por meio da PCR espécie-específica (Figura 7), em 155 animais (90,64%), que corresponde a uma porcentagem de 64,58% em relação ao total de amostras. Não foi detectada a presença de *M. arthritidis* nas amostras clínicas estudadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Número e porcentagem de detecção de micoplasmas pela PCR genérica e espécie-específica a partir do DNA extraído de amostras de lavado traqueal de ratos

Biotérios	Animais	PCR%		
		Genérico	<i>M. pulmonis</i>	<i>M. arthritidis</i>
B1	31	11 (35,48%)	4 (12, 9%)	0
B2	26	25 (96,15%)	25 (96, 15%)	0
B3	30	29 (96, 66%)	29 (96, 66%)	0
B4	30	30 (100%)	30 (100%)	0
B5	31	31 (100%)	31 (100%)	0
B6	32	6 (20%)	1 (3,12%)	0
B7	30	9 (30%)	5 (16,66%)	0
B8	30	30 (100%)	30 (100%)	0
Total	240	171 (71, 25%)	155 (64, 58%)	0

Figura 6- Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando iniciadores MGSO/GPO3 a partir do DNA extraído de amostras de lavado traqueal de ratos. Coluna 1 a 16: amostras de lavado traqueal, amostras positivas 2 a 8 e 14 ; coluna 17: controle positivo *M. pulmonis*; coluna 18: controle negativo; coluna 19: peso molecular 100 pb

Figura 7- Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando iniciadores MP1/MP2 a partir do DNA extraído de amostras de lavado traqueal de ratos. Coluna 1 a 13: amostras de lavado traqueal positivas; coluna 14: postivas *M. pulmonis*; coluna 15: controle negativo; coluna 16: peso molecular 100 pb

5.4 Pesquisa de *M. pulmonis* e *M. arthritidis* em amostras de muco orofaríngeo de bioteristas por meio da PCR espécie-específica

M. pulmonis foi detectado em quatro (10%) amostras de funcionários que não mantinham contato direto com os ratos, sendo uma do biotério 1 e três do biotério 4. Dos bioteristas que mantinham contato direto, 24 (77,4%) foram negativos nas duas coletas, 4 (12,9%) foram positivos após o manejo dos animais, 2 (6,5%) foram positivos em ambas as coletas e 1 (3,2%) foi positivo somente antes da higienização das caixas. Os resultados obtidos pela PCR espécie-específica para a detecção de *M. pulmonis* em bioteristas que mantinham contato direto com os ratos podem ser observados na Tabela 3. Os produtos da PCR para *M. pulmonis* estão representados na Figura 8. Não foi detectada a presença de *M. arthritidis* nas amostra de origem humana.

Tabela 3 – Reações positivas e negativas na PCR para a detecção de *M. pulmonis* a partir de DNA extraído de amostras da orofaringe de bioteristas

Biotério	Funcionário	Detecção de <i>M. pulmonis</i>	
		Antes	Depois
1	01	-	-
1	02	-	-
1	03	+	-
1	04	-	-
1	05	-	-
2	01	-	-
2	02	-	-
2	03	-	-
2	04	-	-
3	01	-	-
3	02	-	-
3	03	-	-
3	04	-	-
4	01	-	+
4	02	-	+
4	03	-	-
5	01	-	-
5	02	+	+
5	03	-	+
5	04	+	+
5	05	-	+
6	01	-	-
6	02	-	-
6	03	-	-
7	01	-	-
7	02	-	-
7	03	-	-
8	01	-	-
8	02	-	-
8	03	-	-
8	04	-	-

+ reação positiva na PCR para *M. pulmonis*

- reação negativa na PCR para *M. pulmonis*

Antes: amostras coletadas dos bioteristas anteriormente ao início do manejo dos animais

Depois: amostras coletadas dos bioteristas posteriormente ao término do manejo dos animais

Figura 8- Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando iniciadores MP1/MP2 a partir do DNA extraído de amostras de muco orofaríngeo de bioteristas. Coluna 1 a 13: amostras de muco orofaríngeo, amostras positivas 2, 4, 11 e 12; coluna 14: controle positivo *M. pulmonis*; coluna 15: controle negativo; coluna 16: peso molecular 100 pb

5.5 Análise do seqüenciamento

Os produtos amplificados pela PCR e seqüenciados, com os iniciadores espécie-específico para *M. pulmonis*, obtidos da cepa de referência e em amostras clinicas de ratos e humanos, apresentaram similaridade de 97% com a seqüência do gene 16S rRNA do *M. pulmonis* depositada no GenBank (AF125582). A figura 9 representa a comparação entre a seqüência do 16S rRNA no GenBank e a obtida pelo seqüenciamento do DNA de uma amostra de bioterista, positiva para *M. pulmonis*.

Figura 9- Seqüência de nucleotídeo do produto amplificado do *M. pulmonis*. Alinhamento da seqüência do gene 16S rRNA (Genbank pelo número AF125582) com a seqüência de nucleotídeos amplificada da amostra de bioterista positiva para *M. pulmonis* utilizando o programa BLASTn (2005)

5.6 Estimativa do risco relativo e razão de chance

A análise estatística permitiu verificar que existe diferença significativa da detecção de *M. pulmonis* pela PCR entre os bioteristas com contato direto ou indireto com os ratos (Tabela 4).

Tabela 4 – Fator associado ao risco de contaminação dos bioteristas por *M. pulmonis*.

Contato	Positivo		Negativo		Total n	χ^2	ERR	OR
	n	%	n	%				
Direto	7	22,6	24	77,4	31	1,26	2,25	2,62
Indireto	4	10,0	36	90,0	40			

χ^2 = Qui-quadrado, $P = 0,05$; ERR = Estimativa de Risco Relativo; OR = Odds Ratio.

6 DISCUSSÃO

A presença de *M. pulmonis* em murinos tem ocorrência mundial nos biotérios. Esta infecção é uma constante preocupação quando estes animais são utilizados na pesquisa (CASSELL et al., 1986). A maioria dos biotérios no Brasil não realiza monitoramento rotineiro para o diagnóstico de micoplasmas (TIMENETSKY, 1999).

Alguns biotérios, mesmo em outros países, utilizam antibióticos no controle desta micoplasmose. Estes agentes antibacterianos apenas minimizam os sintomas da MRM e mascaram a infecção, mas não eliminam o microrganismo do hospedeiro, promovendo a seleção de linhagens resistentes (ELLISON et al., 1992). O descarte de animais doentes no biotério, também não é suficiente para eliminação destes microrganismos neste ambiente (CASSELL et al., 1981a). Neste contexto, os animais assintomáticos tornam-se fonte de infecção, temporária ou permanente.

Neste estudo optou-se por realizar a coleta de material clínico utilizando-se a técnica de lavagem traqueal, devido ao alto grau de isolamento de *M. pulmonis* quando comparados a outros sítios anatômicos (LENTSCH et al., 1979; LAI et al., 1986; BARRETO et al., 2002). Taylor-Robinson et al. (1972) mostraram que o isolamento e cultivo de *M. pulmonis* do lavado traqueal de ratos mortos por MRM foi maior quando comparado ao uso de tecidos infectados.

Utilizando-se o cultivo, o presente trabalho verificou que 75% dos biotérios pesquisados apresentavam-se infectados por *M. pulmonis*. O número de isolamento obtido para *M. pulmonis*, 60% (144/240) das amostras analisadas, foi maior quando comparado ao trabalho de Sanchez et al. (1994) e Goto et al. (1994) e similar aos resultados obtidos por outros pesquisadores (LAI et al., 1986; SIMECKA et al., 1992). Davidson et al. (1981) isolaram 71% (155/219) de *M. pulmonis* em meio

líquido e 47% (102/219) em meio sólido. Lentsch et al. (1979) obtiveram o isolamento desta espécie em 76,7% (79/103) dos lavados traqueais realizados. Machii et al. (1985) apresentaram a positividade de 78% (58/74). Brunnert et al. (1994) (62/62) e Takahashi-Omoe et al. (2004) (7/7) verificaram que 100% dos animais apresentavam-se positivos na cultura para *M. pulmonis*.

Em nosso trabalho o tamanho da amostragem foi de 240 animais com prevalência esperada de 80% utilizando a tabela de prevalência em grandes populações com limite de confiança fixo de 95%, o que justifica a superioridade nos nossos resultados.

No Brasil, existem poucos estudos relacionados ao isolamento de *M. pulmonis* em roedores. Timenetsky e De Luca (1998) obtiveram positividade no isolamento de 89,6% (163/182), Timenetsky et al. (1992) isolaram *M. pulmonis* de 83,79% do lavado traqueal de ratos e Barreto et al. (2002) mostraram que 57,14% dos animais estudados estavam infectados por este agente.

No presente estudo não foi obtido o isolamento de *M. arthritidis* no cultivo. Esta espécie é raramente encontrada em biotérios, no entanto pode ser isolada de ratos saudáveis (COX et al., 1988) e pode ser considerada parte da microbiota residente destes animais. Cole et al. (1967) relataram o isolamento deste agente em pulmões de ratos e Preston (1942) isolou apenas uma amostra de rato com otite média. Timenetsky et al. (1992) isolaram *M. arthritidis* do ouvido médio de 5,4% de ratos de biotério. Outros pesquisadores isolaram este microrganismo de ouvido médio, orofaringe, pulmão e articulação de ratos saudáveis (WARD; COLE, 1970; STEWART; BUCK, 1975; KIRCHHOFF et al., 1983).

Cole e Ward (1979) consideraram a artrite causada por *M. arthritidis* auto-limitante em ratos, sendo capaz de ser detectada somente nas duas primeiras

semanas o que justifica o baixo índice de isolamento desta espécie na literatura e neste trabalho.

A diferenciação entre estas duas espécies, *M. pulmonis* e *M. arthritidis* é necessária porque o último é naturalmente não patogênico (geralmente as infecções são experimentais) e raramente interfere em pesquisas biomédicas que utilizam ratos (KIM et al., 2005) o que difere dos dados de outros autores (CASSELL et al., 1979; CASSELL et al., 1986; HICKMAN, 1986). Existe comercialmente *kits* de ELISA de alta sensibilidade para detecção de *M. pulmonis*, tendo como desvantagem a reação cruzada com *M. arthritidis* (MINION et al., 1983; CASSELL et al., 1984; MACHII et al., 1985; DAVIS et al., 1987; KIM et al., 2005). Desta maneira, é importante que se realize a diferenciação por métodos moleculares (KIM et al., 2005).

Embora não haja dificuldade para o isolamento de algumas espécies de micoplasmas, esforços para realizar a detecção específica destes agentes em estágios precoces da doença estão voltados atualmente para as técnicas de biologia molecular. A PCR é de ampla utilidade na medicina veterinária, pois é uma técnica altamente sensível e específica, que pode ser aplicada no diagnóstico laboratorial, em estudos de genética de populações e análise forense.

O desenvolvimento de métodos diagnósticos sensíveis para diversos micoplasmas foi considerado necessário por BLANCHARD et al. (1991), principalmente para espécies de crescimento lento, como o *M. genitalium* de origem humana. A PCR é considerada um dos métodos mais eficaz e atualmente essencial para a detecção de micoplasmas (KEMPF, 1998; DAXBOECK et al., 2003). A metodologia da PCR foi introduzida como diagnóstico em 1980 e mostrou-se mais sensível que os testes baseados na hibridização direta com sondas de DNA. É uma metodologia rápida, que copia uma única sequência bilhões de vezes em um período de três horas. Não há limitações quanto à viabilidade do microrganismo em

crescer em culturas, sendo uma característica de considerável importância, uma vez que os micoplasmas são exigentes nutricionalmente e alguns não são cultiváveis *in vitro* (phytoplasmas e haemoplasmas) (RAZIN, 1994).

A extração do DNA, descrita por Fan et al. (1995) e utilizada neste estudo, é uma metodologia de fácil execução, de baixo custo e que não utiliza compostos tóxicos, como o fenol. A ausência da parede celular dos micoplasmas facilita o rompimento da membrana citoplasmática e a liberação do DNA bacteriano. Buzinhani (2001) ao testar os métodos de extração por fenol, sílica e fervura, demonstrou maior sensibilidade para a detecção de micoplasmas em muco vulvovaginal de fêmeas bovinas pela metodologia do choque térmico.

A PCR com iniciadores genéricos realizada neste estudo foi utilizada como triagem para a detecção de micoplasmas nas amostras clínicas de ratos e posterior identificação das espécies descritas neste trabalho. Os resultados obtidos mostraram a detecção de micoplasmas em 71,25% das amostras coletadas.

As amostras clínicas positivas na PCR genérica foram submetidas a PCR espécie-específica para *M. pulmonis* e *M. arthritidis*. O *M. pulmonis* foi detectado em 64,58% (155/240) dos animais. Os resultados encontrados são maiores que os apresentados por Goto et al. (1994) que encontraram 57,4% pela PCR. Brunnert et al. (1994) observaram maior positividade para *M. pulmonis* 96,7% (60/62). *M. arthritidis* não foi detectado em nenhuma das amostras clínicas de ratos submetidas a PCR espécie-específica. Resultado semelhante foi apresentado por Kim et al. (2005).

O teste de sensibilidade da PCR realizada neste trabalho evidenciou a possibilidade em detectar 1 fg de DNA/ μ l de *M. pulmonis* e de 10 pg de DNA/ μ l de *M. arthritidis*. De acordo com Verdin et al. (2000), considerando o tamanho do DNA de *M. hyopneumoniae* (1140 Kb) como referência, determinaram a sensibilidade de

500 fg para a detecção pelo PCR utilizando um único par de oligonucleotídeos iniciadores, que corresponde a 5×10^2 microrganismos. Analogamente, o *M. pulmonis* já apresenta o seu genoma seqüenciado (963 Kb) (CHAMBAUD et al., 2001) e a PCR utilizada neste estudo necessitaria de um microrganismo para a sua detecção. Para o *M. arthritidis*, apesar da falta de dados sobre o tamanho do DNA, seria necessário 10^4 microrganismos.

Neste trabalho a sensibilidade da PCR para detectar *M. pulmonis* foi maior do que as apresentadas por outros autores. Takahashi-Omoe et al. (2004) mostraram sensibilidade de 10 pg de DNA/ μ l. Sanchez et al. (1994) e Schoeb et al. (1997) evidenciaram sensibilidade de 1 pg de DNA/ μ l. Harasawa et al. (1990) apresentaram sensibilidade de 0,5 pg de DNA/ μ l. Na literatura não existe dados referentes a sensibilidade da PCR para *M. arthritidis*.

O teste de especificidade realizado neste estudo mostrou que não há reação cruzada entre *M. pulmonis* e outras espécies de micoplasmas e o ácido nucléico humano. Também não ocorre reação cruzada entre *M. arthritidis* e estas mesmas espécies, sendo semelhante aos resultados apresentados por Takahashi-Omoe et al. (2004) e Van Kuppeveld et al. (1992).

A detecção de gêneros da classe *Mollicutes* pela PCR genérica e a negatividade com oligonucleotídeos iniciadores específicos para as espécies em estudo indicam a presença de outros micoplasmas que não foram pesquisadas neste trabalho. *Acholeplasma laidlawii* é um micoplasma que pode estar presente no meio ambiente podendo colonizar diversos hospedeiros e poderia estar nas amostras estudadas. No entanto, não se pode desconsiderar outros micoplasmas de origem murina ou espécies pouco estudadas.

A PCR espécie-específica detectou um número maior de amostras positivas para *M. pulmonis* do que a cultura, 64,58% e 60%, respectivamente. Outros autores

apresentaram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo como Goto et al. (1994) que encontraram positividade de 57,4% na PCR e 51,85% na cultura, concordando com os resultados obtidos. Sanchez et al. (1994) apresentaram um baixo índice de isolamento (20%) quando comparado a PCR (100%). O número de animais utilizados em nosso trabalho foi maior do que nos estudos citados, o que justifica a variação no índice de isolamento e na detecção pela PCR. Van Kuppeveld et al. (1993), após inoculação experimental de *M. pulmonis*, obtiveram cultura positiva em 86,4% (70/81) dos animais e positividade de 100% na PCR.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a PCR é mais sensível do que a cultura e a detecção de *M. pulmonis* ocorreu em 100% dos biotérios quando comparada a cultura (75%). Este resultado também está de acordo com os apresentados por Timenetsky e De Luca (1998) que afirmaram que 100% dos biotérios convencionais estão infectados.

Diagnósticos laboratoriais de infecções causadas por micoplasmas são usualmente realizados pela detecção de anticorpos específicos ou cultivo. A cultura proporciona a identificação da espécie infectante com a possibilidade de estudos epidemiológicos e profiláticos da enfermidade. Entretanto, as técnicas de isolamento são demoradas e trabalhosas, sendo restritas a poucos laboratórios. O transporte, tipo de material clínico, rápido processamento das amostras, utilização de meios de cultura que satisfaçam as exigências nutricionais, uso de antibióticos para o controle de microrganismos contaminantes, técnicas de diluição e o número de microrganismos presentes no material clínico aumentam a chance de isolamento (METTIFOGO, 2003; OLIVEIRA, 2003). As limitações apresentadas pela cultura podem ser minimizadas com a associação de técnicas moleculares para a detecção destes agentes.

Atualmente, seqüências completas do gene 16S rRNA, de quase todos *Mollicutes* estabelecidos, estão disponibilizadas em bancos de dados. Esta facilidade de seleção de uma variedade de seqüências alvo, com seqüências de genes altamente conservados propicia a produção de oligonucleotídeos iniciadores de grande especificidade. Numerosas publicações comparam resultados desta técnica com culturas e testes sorológicos que indicam alta sensibilidade e rapidez da PCR. Porém, a PCR também é laboriosa, cara e complexa para aplicar na rotina de laboratórios clínicos e deve ter seu resultado analisado de forma criteriosa quando utilizada como instrumento de diagnóstico na infecção por micoplasma (RAZIN, 1994).

A análise estatística realizada neste estudo mostrou uma diferença significativa na detecção de *M. pulmonis* em comparação com os indivíduos que mantinham contato direto com os animais e indivíduos que por alguma barreira estavam indiretamente em contato ($\chi^2 = 1,26$; $P = 0,05$). No estudo caso-controle, somente a razão de chances deve ser calculada como medida de uma associação. No entanto, pode-se utilizar o risco relativo como medida de associação, pois mesmo utilizando-se a razão de chance é importante conhecer o quanto ela se aproxima do risco relativo. Isto nos mostra uma estimativa do risco relativo baseado na razão de chances que é obtida dos estudos caso-controle. Em nosso estudo observou-se um aumento da positividade entre os humanos que mantinham contato direto em relação aqueles que tinham alguma barreira. Os indivíduos positivos que apresentavam contato direto com os ratos tiveram 2,62 vezes mais possibilidade de se contaminarem do que os que apresentavam contato indireto.

Sendo assim, os indivíduos que estão envolvidos diariamente nos biotério, em contato direto ou indireto com os animais, estão expostos a este microrganismo, pelos aerossóis gerados principalmente pelo espirro dos animais. Esta afirmação

pode ser justificada quando comparamos o número de bioteristas em que se detectou *M. pulmonis* em um biotério com alta positividade dos animais, tanto pelo cultivo como pela PCR (biotérios 4 e 5). A ausência de *M. pulmonis* em funcionários de outros biotérios que também apresentaram um alto índice de isolamento e detecção pode estar associada a medidas de higiene e boas práticas de laboratório. Existe também a possibilidade da infecção por micoplasmas ser transmitida a técnicos laboratoristas, que manipulam grandes concentrações do microrganismo, e possuem, portanto, maior chance de se contaminarem acidentalmente (COLLINS, 1993).

Os resultados apresentados mostraram que o *M. pulmonis* pode estar presente na orofaringe dos bioteristas que mantêm contato direto ou indireto com ratos, o que foi confirmado pelo seqüenciamento, sugerindo uma não especificidade de tal agente, confirmando a afirmação de Razin (1992), que os micoplasmas podem estar presentes em hospedeiros inespecíficos. Quando analisamos os resultados, pudemos verificar que a detecção deste agente foi maior após a higienização das caixas, sugerindo que o micoplasma possa ter sido transmitido durante a manipulação. Desta mesma forma foi possível a detecção deste agente em alguns funcionários antes e depois da manipulação, o que pode ser entendido como uma maior exposição ao agente devido a falta de cuidados rotineiros e/ou ausência de barreiras físicas. No entanto, a presença de um caso, no qual a detecção ocorreu somente antes da manipulação, pode se argumentar que houve uma falha durante a segunda coleta. Este achado ainda não pode ser relacionado com a literatura devido a falta de estudos do aspecto da qualidade e segurança dos biotérios, bem como na relação de *M. pulmonis* e humanos.

M. arthritidis não foi detectado em nenhuma amostra de bioterista analisada. No entanto, esta espécie foi isolada de humanos (trato genital e articulação) e de

primatas não humanos, mas sua capacidade de causar doença nestes hospedeiros não foi estabelecida (BARTHOLOMEW, 1967; JANSSON; WAGER, 1967; COLE; WARD, 1979). Este agente foi isolado do líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, mas sua significância etiológica não foi determinada (JANSSON et al., 1971).

O *M. arthritidis* possui um superantígeno (MAM - *M. arthritidis antigen*), uma potente proteína imunomodulatória, que pode ativar células T, B, NK e monócitos de ratos e humanos (AL-DACCAK et al., 1994; RINK et al., 1996; SAWITZKE et al., 2000). Alguns estudos mostram que o MAM é uma importante ferramenta para se estudar o papel dos superantígenos em doenças autoimunes de humanos incluindo a artrite reumatóide (SAWITZKE et al., 2000).

As artrites causadas por micoplasmas servem como modelo para o estudo da artrite reumatóide, mas a questão do envolvimento de micoplasmas nesta doença não está elucidada. No entanto, não há dúvida de que estes agentes possam causar outros quadros de artrite em humanos, como por exemplo, a ocorrência de um quadro de artrite após uma complicação de doença respiratória causada por *M. pneumoniae* (WASHBURN, 1996). Os micoplasmas podem ser responsáveis por artrite séptica em pacientes com imunossupressão. No entanto, é controverso se os micoplasmas podem iniciar ou perpetuar a doença inflamatória nas articulações de pacientes com artrite reumatóide (SCHAEVERBEKE et al., 1997).

Em estudo realizado por Sawitzke et al. (2000) foi pesquisada a presença de anticorpos anti-MAM em pacientes apresentando artrite reumatóide e os resultados mostraram que o nível de anticorpos estava elevado nestes pacientes, sugerindo que o MAM pode estar associado a esta enfermidade. Gorina et al. (1985), utilizando-se de técnica imunoenzimática, detectaram a presença de anticorpos contra *M. arthritidis* no soro de pacientes apresentando quadro de artrite reumatóide.

Resultados apresentados por outros autores também mostraram a presença de micoplasmas não específicos em hospedeiros não usuais (MADOFF et al., 1979; MCCABE et al., 1987; YECHOURON et al., 1992; BAKER et al., 1998). Rottem (2003) concluiu que micoplasmas de origem animal poderiam ser encontradas no homem podendo provocar doença. Rosenbusch (1994) afirmou que a maioria das espécies de micoplasmas tem um hospedeiro específico e outros podem ser patogênicos para uma espécie e colonizar uma outra sem expressar patogenicidade.

O controle da presença de *M. pulmonis* e *M. arthritidis* em animais de laboratório indica a eficácia da qualidade do biotério e dos animais. No entanto, o hospedeiro humano neste contexto é ainda desconhecido e desconsiderado. O achado de *M. pulmonis* em bioteristas pode indicar um novo panorama dos micoplasmas em biotérios de ratos e camundongos.

7 CONCLUSÕES

M. pulmonis foi a única espécie de micoplasma de origem murina isolada;

A PCR genérica para *Mollicutes* pode ser utilizada como triagem para a detecção destes microrganismos no lavado traqueal de ratos;

A PCR para a detecção de *M. pulmonis* e *M. arthritidis* mostraram-se específicas e sensíveis após a otimização;

M. pulmonis foi detectado pela PCR na maioria dos lavados traqueais de ratos;

M. arthritidis não foi detectado pela PCR nas amostras de lavado traqueal de ratos analisadas;

A associação dos resultados da cultura e PCR deve ser considerada para o diagnóstico laboratorial de micoplasmas em ratos;

A detecção de *M. pulmonis* na orofaringe de bioteristas confirma a contaminação de humanos por meio de contato direto ou indireto com animais de laboratório e sugere possíveis alterações no manejo sanitário dos biotérios;

Verificou-se que o contato direto entre bioteristas e ratos é um fator de risco;

REFERÊNCIAS

AL-DACCAK, R.; MEHINDATE, K.; HEBERT, J.; RINK, L.; MECHERI, S.; MOURAD, W. Mycoplasma arthritidis-derived superantigen induces proinflammatory monokine gene expression in the THP-1 human monocytic cell line. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2409-2416, 1994.

ARAUJO, J. I.; TIMENETSKY, J.; ÁVILA, F. A. Avaliação da imunogenicidade de uma vacina experimental obtida a partir de *Mycoplasma pulmonis* isolado de ratos (*Rattus norvegicus*) naturalmente infectados. **ARS Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 80-86, 2003.

BAKER, A. S.; RUOFF, K. L.; MADOFF, S. Isolation of mycoplasma species from a patient with seal finger. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 1168-1170, 1998.

BAKER, D. G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 231-266, 1998.

BAKER, H. J.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. In: _____. (Eds.). **The laboratory rat: research applications**. New York: Academic Press Inc., 1980. v. 2, 276 p.

BARILE, M. F.; GRABOWSKI, H. W.; GRAHAM, C.; SNOY, P.; CHANDLER, D. K. F. Experimentally induced *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in non-humans primates. **IOM Letters**, v. 1, p. 158-159, 1990.

BARRETO, M. L.; NASCIMENTO, E. R.; CAMPOS, C. A. M.; NASCIMENTO, M. G. F.; LIGNON, G. B.; LIRA, M. L. F.; SILVA, R. G. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in laboratory rats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 260-264, 2002.

BARTHOLOMEW, L. E. Characterization of mycoplasmas strains and antibody studies from patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 143, n. 1, p. 522-534, 1967.

BASEMAN, J.B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: sophisticated reemerging and burdened by their notoriety. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 21-32, 1997.

BELL, D.; WHEELER, S. M. Susceptibility of caesarian-derived rats to natural infection with chronic respiratory disease. **Laboratory Animal**, v. 4, p. 45-53, 1970.

BERGEY'S Manual of determinative bacteriology. Michigan: Michigan State University, 2001. Disponível em: <<http://www.cme.msu.edu/bergeys>>. Acesso em: 14 mar. 2005.

BINDER, A.; AUMULLER, R.; LIKITDECHAROTE, B; KIRCHOFF, H. Isolation of *Mycoplasma arthritidis* from the joint fluid of boars. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, p. 611-614, 1990.

BLANCHARD, A.; GAUTIER, M.; MAYAU, V. Detection and identification of mycoplasmas by amplification of rDNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 81, p. 37-42, 1991.

BLASTn. Disponível em <www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/BLAST>. Acesso em 5 Out. 2005.

BONILLA, H. F.; CHENOWETH, C. E.; TULLY, J. G.; BLYTHE, L. H.; ROBERTSON, J. A.; OGNENOWSKI, V. M.; KAUFFMAN, C. A. *Mycoplasma felis* septic arthritis in a patient with hipogammaglobulinemia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, p. 222-225, 1997.

BRODERSON, J. R.; LINDSEY, J. R.; CRAWFORD, J. E. The role of environmental ammonia in respiratory mycoplasmosis of rats. **American Journal of Pathology**, v. 85, p. 115-130, 1976.

BRUNNERT, S. R.; DAI, Y.; KOHN, D. F. Comparison of Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry for the detection of *Mycoplasma pulmonis* in paraffin-embedded tissue. **Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 3, p. 257-260, 1994.

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

CARDOSO, T. A. O. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Boletín del centro panamericano de fiebre aftosa**. [entre 1998 e 2001]. Disponível em: < www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/boletin-aft-67-67a.pdf >. Acesso em 08 Out. 2005.

CARSON, J. L., HU, P. C.; COLLIER, A. 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.

CARTNER, S. C.; SIMECKA, J. W.; BRILES, D. E.; CASSELL, G. H.; LINDSEY, J. R. Resistance to mycoplasmal lung disease in mice is a complex genetic trait. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 5326-5331, 1996.

CARTNER, S. C.; SIMECKA, J. W.; LINDSEY, J. R.; CASSELL, G. H.; DAVIS, J. K. Chronic respiratory mycoplasmosis in C3H/HeN and C57BL/6N mice: lesion severity and antibody response. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4138-4142, 1995.

CASSELL, G. H. Derrick Edward Award Lecture. The pathogenic potential of mycoplasmas: *Mycoplasma pulmonis* as a model. **Reviews of Infectious Diseases**, p. 18-34, 1982. Supplementum 4.

CASSELL, G. H.; DAVIS, J. K.; COX, N. R.; DAVIDSON, M. K.; LINDSEY, J. R. *Mycoplasma pulmonis* detection in rodents: lessons for diagnosis in other species. **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 20, p. 859-865, 1984.

CASSELL, G. H.; DAVIS, J. K.; SIMECKA, J. W.; LINDSEY, J. R.; COX, N. R.; ROSS, S. E.; FALLON, M. Mycoplasma infections: diseases pathogenesis, implication for biomedical research and control. In: BHATT, P. N.; JACOBY, R. O.; MORSE III, H. C.; NEW, A. E. (Eds.). **Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents: effects on biomedical research**. Orlando, Fla.: Academic Press, 1986. p. 87-130.

CASSELL, G. H.; LINDSEY, J. R.; BAKER, H. J.; DAVIS, J. K. Mycoplasmal and rickettsial diseases. In: BAKER, J. H.; LINDSEY, J. R.; WEISBROTH, S. H. **The laboratory rat: Biology and diseases**. New York: Academic Press, 1979. v. 1, p. 243-269.

CASSELL, G. H.; LINDSEY, J. R.; DAVIS, J. K.; DAVIDSON, M. K.; BROWN, M. B.; MAYO, J. G. Detection of natural *Mycoplasma pulmonis* infection in rats and mice by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Laboratory Animal Science**, v. 31, p. 676-682, 1981a.

CASSELL, G. H.; WILBORN, W. H.; SILVERS, S. H.; MINION, F. C. Adherence and colonization of *Mycoplasma pulmonis* to genital epithelium and spermatozoa in rats. **Israel Journal of Medical Science**, v. 17, n.7, p. 593-598, 1981b.

CHAMBAUD, I.; HEILIG, R.; FERRIS, S.; BARBE, V.; SAMSON, D.; GALLISON, F.; MOSZER, I.; DYBVIG, K.; WRÓBLEWSKI, H.; VIARI, A.; ROCHA, E. P. C.; BLANCHARD, A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 10, p. 2145-2153, 2001.

CLYDE, W. A. Recovery of mycoplasmas from the respiratory tract. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. **Methods in mycoplasmaology**. Diagnostic mycoplasmaology. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1983. v. 2, p. 9-17.

COLE, B. C.; MILLER, M. L.; WARD, J. R. A comparative study on the virulence of *Mycoplasma arthritidis* and "*Mycoplasma hominis* type 2" strains in rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 124, n. 1, p. 103-107, 1967.

COLE, B. C.; WARD, J. R. Mycoplasmas as arthritogenic agents. In: TULLY, J. G.; WITHCOMB, R. F. (Eds.). **The Mycoplasmas II: Human and Animal Mycoplasmas**. San Francisco: Academic Press, 1979. p. 367-398.

COLE, B. C.; WASHBURN, L. R.; TAYLOR-ROBINSON, D. Mycoplasma-induced arthritis. In: RAZIN, S.; BARILE, M. F. (Eds.). **The Mycoplasmas**. Mycoplasma pathogenicity. New York: Academic Press, 1985. v. 4, p.108-150.

COLLINS, C. H. **Laboratory acquired infections**. Oxford: Butterworth – Heinemann, 1993, p. 28-40.

COX, N. R.; DAVIDSON, M. K.; DAVIS, J. K.; LINDSEY, J. R.; CASSELL, G. H. Natural mycoplasmal infections in isolator-maintained LEW/Tru rats. **Laboratory Animal Science**, v. 38, p. 381-388, 1988.

DAVIDSON, M. K.; DAVIS, J. K.; GAMBILL, G. P.; CASELL, G. H.; LINDSEY, J. R. Mycoplasmas of laboratory rodents. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Eds.). **Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis**. Iowa: Iowa State University Press, 1994. p. 97-133.

DAVIDSON, M. K.; LINDSEY, J. R.; BROWN, M. B.; SCHOEB, T. R.; CASSELL, G. H. Comparison of methods for detection of *Mycoplasma pulmonis* in experimentally and naturally infected rats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, p. 644-646, 1981.

DAVIS, J. K.; CASSELL, G. H. Murine respiratory mycoplasmosis in LEW and F344 rats: strain differences in lesion severity. **Veterinary Pathology**, v. 19, n. 3, p. 280-293, 1982.

DAVIS, J. K.; CASSELL, G. H.; GAMBILL, G.; COX, N.; WATSON, H.; DAVIDSON, M. Diagnosis of murine mycoplasmal infections by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Israel Journal of Medical Sciences**, v. 23, p. 717-722, 1987.

DAXBOECK, F.; KRAUSE, R.; WENISCH, C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 4, p. 263 -273, 2003.

DE LUCCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N. L.; MERUSSE, J. L. B.; NEVES, S. P. In: _____. (Eds.) **Manual para técnicos de laboratório**. São Paulo/SP: COBEA/FINEP. 1996, 259 p.

DEEB, B. J.; KENNY, G. E. Characterization of *Mycoplasma pulmonis* variants isolated from rabbits. I Identification and properties of isolates. **Journal of Bacteriology**, v. 93, p. 1416-1424, 1967.

DELGADO, M. O.; TIMENETSKY, J. Immunoblot profiles of sera from laboratory rats naturally infected with *Mycoplasma pulmonis* and technicians exposed to infected animals facilities. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 32, p. 301-304, 2001.

DYBVIG, K.; VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annual Review of Microbiology**, v. 50, p. 25-57, 1996.

ELLISON, J. S.; OLSON, L. D.; BARILE, M. F. Immunity and vaccine development. In: In: MANILOFF, J. (Ed.) **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992, p. 491-504.

ERICKSON, B. Z.; ROSS, R. F.; BOVÉ, J. M. Isolation of *Mycoplasma salivarium* from swine. **Veterinary Microbiology**, v. 16, p. 384-390, 1988.

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

FURR, P. M.; HETHERINGTON, C. M.; TAYLOR-ROBINSON, D. The susceptibility of germ-free, oestradiol-treated, mice to *Mycoplasma hominis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 30, p. 233-236, 1989.

FURR, P. M.; TAYLOR-ROBINSON, D. Oestradiol-induced infection of the genital tract of female mice by *Mycoplasma hominis*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 2743-2749, 1989.

GIDDENS, W. E.; WHITEHAIR, C. K.; CARTER, G. R. Morphologic and microbiologic features of nasal cavity and middle ear in germ-free, defined-flora, conventional, and chronic respiratory diseases-affected rats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, p. 99-114, 1971.

GILIOLI, R. **Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e ratos em biotérios brasileiros**: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. 2003. 138 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GORDIS, L. **Epidemiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 302 p.

GORINA, L. G.; SALAMOVA, R. E.; TSVETKOV, V. S.; PROZOROVSKII, S. V. Detection of *Mycoplasma arthritidis* and *Mycoplasma fermentans* antibodies in rheumatoid arthritis patients by an immunoenzyme method. **Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii**. v. 6, p. 48-52, 1985.

GOTO, K.; KUNITA, S.; TERADA, E.; ITOH, T. Comparison of Polymerase Chain Reaction and culture methods for detection of *Mycoplasma pulmonis* from nasal, tracheal, and oral swab samples of rats. **Experimental Animals**, v. 43, n. 3, p. 413-415, 1994.

GRAHAM, W. R. Recovery of a pleuropneumonia-like organism (P. P. L. O.) from the genitalia of the female rat. **Laboratory Animal Care**, v. 13, p. 719-724, 1963.

HARASAWA, R.; KOSHIMIZU, K.; UEMORI, T.; TAKEDA, O.; ASADA, K.; KATO, I. The Polymerase Chain Reaction for *Mycoplasma pulmonis*. **Microbiology and Immunology**, v. 34, n. 4, p. 393-395, 1990.

HICKMAN, R. L. Toxicology: Complications caused by murine viruses and mycoplasmas. In: BHATT, P. N.; JACOBY, R. O.; MORSE III, H. C.; NEW, A. E. (Eds.). **Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents**: effects on biomedical research. Orlando, Fla.: Academic Press, 1986. p. 693-719.

HILL, A. Mycoplasmas of small animals. In: BOVÉ, J. M.; DUPLAN, J. F. **Mycoplasmas of man, animals, plants, and insects**. Paris: INSERM, 1974. p. 311-316.

INNES, J. R.; DONATI, E. J.; ROSS, M. A.; STOUFFER, R. M.; YEVICH, P. P.; WILSON, C. E.; FARBER, J. R.; PANKEVICIUS, J. A.; DOWNING, T. O. Establishment of a rat colony free from chronic murine pneumonia. **The Cornell Veterinarian**, v. 47, n. 2, p. 260-280, 1957.

JANSSON, E.; MAKISARA, P.; VAINIO, K.; VAINIO, U.; SNELLMAN, O.; TUURI, S. An 8-year study on mycoplasma in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 30, n. 5, p. 506-508, 1971.

JANSSON, E.; WAGER, O. Mycoplasma in collagen diseases and blood dyscrasia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 143, n. 1, p. 535-543, 1967.

JERSEY, G. C.; WHITEHAIR, C. K.; CARTER, G. R. Mycoplasma pulmonis as the primary cause of chronic respiratory disease in rats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 163, n. 6, p. 599-604, 1973.

KAPPEL, H. K.; KAPPEL, J. P.; WEISBROTH, S. H. Establishment of a hysterectomy-deprived pathogen-free nucleus of BLU: (LE) rats. **Laboratory Animal Care**, v. 19, n. 5, p. 738-741, 1969.

KAPPEL, H. K.; NELSON, J. B.; WEISBROTH, S. H. Development of a screening technique to monitor a mycoplasma-free BLU: (LE) Long-Evans rat colony. **Laboratory Animal Care**, v. 24, n. 5, p. 768-772, 1974.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiology investigations of avian mycoplasmosis. **Avian Pathology**, v. 27, p. 07-14, 1998.

KIM, D-J.; PARK, J-H.; SEOK, S-H.; CHO, S-A.; BAEK, M-W.; LEE, H-Y.; YANG, K-H.; JANG, D. D.; HAN, B-S.; PARK, J-H. Differential identification of *Mycoplasma pulmonis* and *M. arthritidis* using PCR-based RFLP. **Experimental Animals**, v. 54, n. 4, p. 359-362, 2005.

KIRCHHOFF, H.; HEITMANN, J.; AMMAR, A.; HERMANN, W.; SCHULZ, L-C. Studies of polyarthritis caused by *Mycoplasma arthritidis* in rats I. Detection of the persisting mycoplasma antigen by the enzyme immune assay (EIA) and conventional culture technique. **International Journal of Microbiology and Hygiene A**, v. 254, p. 129-138, 1983.

KOHN, D. F.; BARTHOLD, D. V. W. Biology and diseases of rats. In: _____. **Laboratory Animal Medicine**. New York: Academic Press, 1984, p. 91-122.

KOHN, D. F.; KIRK, B. E. Pathogenicity of *Mycoplasma pulmonis* in laboratory rats. **Laboratory Animal Care**, v. 19, p. 321-330, 1969.

LAI, W. C.; PAKES, S. P.; STEFANU, C.; LU, Y-S. Comparison of Chalquest and Hayflick media, with and without ammonium reineckate, for isolating *Mycoplasma pulmonis* from rats. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 817-821, 1986.

LANE-PETTER, W.; OLDS, R.J., HACKING, M. R.; LANE-PETTER, M. E. Respiratory disease in a colony of rats. I. The natural disease. **The Journal of Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 655-662, 1970.

LENTSCH, R. H.; WAGNER, J. E.; OWENS, D. R. Comparison of techniques for primary isolation of respiratory *Mycoplasma pulmonis* from rats. **Infection and Immunity**, v. 26, n. 2, p. 590-593, 1979.

LINDSEY, J. R. Prevalence of viral and mycoplasmal infections in laboratory rodents. In: BHATT, P. N.; JACOBY, R. O.; MORSE III, H. C.; NEW, A. E. (Eds.). **Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents: effects on biomedical research**. Orlando, Fla.: Academic Press, 1986. p. 801-808.

LINDSEY, J. R.; BAKER, H. J.; OVERCASH, R. G.; CASSELL, G. H.; HUNT, C. E. Murine chronic respiratory disease. Significance as a research complication and experimental production with *Mycoplasma pulmonis*. **American Journal of Pathology**, v. 64, p. 675-716, 1971.

LINDSEY, J. R.; CONNER, M. W. Influence of cage sanitization frequency on intracage ammonia (NH₃) concentration and progression of murine respiratory mycoplasmosis in the rat. **Medical Microbiology, infectious diseases, virology, parasitology**, v. 241, p. 215, 1978.

LINDSEY, J. R.; DAVIDSON, M. K.; SCHOEB, T. R.; CASSELL, G. H. Mycoplasma pulmonis-host relationships in a breeding colony of Sprague-Dawley rats with enzootic murine respiratory mycoplasmosis. **Laboratory Animal Science**, v. 35, n. 6, p. 597-607, 1985.

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. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 357-364, 1992.

MACHII, K.; OTSUKA, Y.; IWAI, H.; UEDA, K.; SUZUKI, E.; SAITO, M.; NAKAGAWA, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in diagnosis of *Mycoplasma pulmonis* infection in rats. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 47, n. 5, p. 845-848, 1985.

MACKENZIE, W. F.; MAGILL, L. S.; HULSE, M. A filamentous bacterium associated with respiratory disease in wild rats. **Veterinary Pathology**, v. 18, n. 6, p. 836-839, 1989.

MADOFF, S.; PIXLEY, B. Q.; DELGIUDICE, R. A.; MOELLERING, J. R. Isolation of *Mycoplasma bovis* from a patient with systemic illness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, p. 709-711, 1979.

MANILOFF, J. The minimal cell genome: "On being the right size". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 10004-10006, 1996.

MCCABE, S. J.; MURRAY, J. T.; RUHNKE, H. L.; RACHILIS, A. Mycoplasma infection of a hand acquired from a cat. **Journal of Hand Surgery**, v. 12, n. 6, p. 1085-1088, 1987.

MCCORMACK, W. M. Susceptibility of mycoplasmas to antimicrobial agents: clinical implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, p. 200-201, 1993.

METTIFOGO, E. **Micoplasmas aviários: diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase multiplex e tipificação genômica com primers arbitrários e eletroforese de campo pulsado de cepas de *Mycoplasma gallisepticum***. 2003. 178 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

MINION, F. C.; BROWN, M. B.; CASSELL, G. H. Identification of cross-reactive antigens between *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis*. **Infection and Immunity**, v. 43, n. 1, p. 115-121, 1983.

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

MORTON, H. E. Mycoplasmas from man undetermined specific relationship to their human host. In: SHARP, J. T. (Ed.). **The role of mycoplasmas and L forms of bacteria in disease**. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publishers, 1970. p. 147-171.

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.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Barrier programs in infectious diseases of mice and rats. **A report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats**. Washington DC: National Academy Press, 1991a. p. 17-20.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Individual disease agents and their effect on research. **Infectious diseases of mice and rats**. Washington DC: National Academy Press, 1991b. p. 33-84; 164-197.

OGATA, S. Recovery and identification of canine and feline mycoplasmas. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. **Methods in mycoplasmaology**, Diagnostic mycoplasmaology. San Diego, CA: Academic Press, Inc., 1983. v. 2, p. 105-113.

OLIVEIRA, R. C. **Utilização de estirpe local na prova de soroaglutinação microscópica para leptospirose canina**. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agrárias - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

OLSON, L. D.; RENSHAW, C. A.; ROTTEM, S.; BOAL, J. H. Arginine utilization by *Mycoplasma fermentans* is not regulated by glucose metabolism ¹³C-NMR study. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, p. 47-52, 1993.

PINSON, D. M.; SCHOEB, T. R.; LIN, S. L.; LINDSEY, J. R. Promotion of *Mycoplasma pulmonis* growth in rat tracheal organ cultures by ammonium chloride. **Laboratory Animal Science**, v. 38, n. 2, p. 143-147, 1988.

PRESTON, W. S. Arthritis in rats caused by pleuropneumonia-like microorganisms and the relationship of similar organisms to human rheumatism. **Journal of Infectious Diseases**, v. 70, p. 180-184, 1942.

RAZIN, S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, n. 6, p. 497-511, 1994.

RAZIN, S. Molecular properties of *Mollicutes*: a synopsis. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. California: Academic Press, 1995. v. 1, p. 33-40.

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

RAZIN, S. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society of Microbiology, 1992. p. 3-22.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiological Reviews**, v. 42, p. 414-470, 1978.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. Mycoplasma characterization. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G (Eds.). **Methods in Mycoplasmaology**. New York: Academic Press, 1983. p. 150-176.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.

RINK, L.; NICKLAS, W.; LUHM, J.; KRUSE, R.; KIRCHNER, H. induction of a proinflammatory cytokine network by *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen (MAS). **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 16, n. 10, p. 861-868, 1996.

ROSENBUSCH, R. F. Biology and Taxonomy of the Mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Eds.). **Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis**. Iowa: Iowa State University Press, 1994. p. 1-11.

ROTTEM, S. Interaction of Mycoplasmas with Host Cells. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 417-432, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA. In: SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (Eds.). **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 916-919.

SANCHEZ, S.; TYLER, K.; ROZENGURT, N.; LIDA, J. Comparison of a PCR-based diagnostic assay for *Mycoplasma pulmonis* with traditional detection techniques. **Laboratory Animals**, v. 28, p. 249-256, 1994.

SAWITZKE, A.; JOYNER, D.; KNUDSTON, K.; MU, H. H.; COLE, B. Anti-MAM antibodies in rheumatic disease: evidence for MAM-like superantigen in rheumatoid arthritis? **The Journal of Rheumatology**, v. 27, n. 2, p. 358-364, 2000.

SCHAEVERBEKE, T.; VERNHES, J. P.; LEQUEN, L.; BANNWARTH, B.; BEBEAR, C.; DEHAIS, J. Mycoplasmas and arthritides. **Revue du Rhumatismen**, v. 64, n. 2, p. 120-128, 1997.

SCHOEB, T. R.; DAVIDSON, M. K.; LINDSEY, J. R. Intracage ammonia promotes growth of *Mycoplasma pulmonis* in the respiratory tract of rats. **Infection and Immunity**, v. 38, n. 1, p. 212-217, 1982.

SCHOEB, T. R.; DYBVIG, K.; KEISLING, K. F.; DAVIDSON, M. K.; DAVIS, J. K. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in cilia-associated respiratory bacillus isolates and in respiratory tracts of rats by Nested PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1667-1670, 1997.

SCHOEB, T. R.; LINDSEY J. R. Exacerbation of murine respiratory mycoplasmosis by sialodacryoadenitis virus infection in gnotobiotic F344 rats. **Veterinary Pathology**, v. 24, n. 5, p. 392-399, 1987.

SCHUNK, M. K.; PERCY, D. H.; ROSENDAL, S. Effect of time of exposure to rat coronavirus and *Mycoplasma pulmonis* on respiratory tract lesions in the Wistar rat. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n. 1, p. 60-66, 1995.

SIMECKA, J. W.; DAVIS, J. K.; DAVIDSON, M. K.; ROSS, S. E.; STADTLANDER, C. T. K.; CASSELL, G. H. Mycoplasma disease of animals. In: MANILOFF, J. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992. p. 391-415.

STEWART, D. D.; BUCK, G. E. The occurrence of *Mycoplasma arthritidis* in the throat and middle ear of rats with chronic respiratory disease. **Laboratory Animal Science**, v. 25, n. 6, p. 769-773, 1975.

TAKAHASHI-OMOE, H.; OMOE, K.; MATSUSHITA, S.; KOBAYASHI, H.; YAMAMOTO, K. Polymerase Chain Reaction with a primer pair in the 16S-23S rRNA spacer region for detection of *Mycoplasma pulmonis* in clinical isolates. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 117-128, 2004.

TAYLOR-ROBINSON, D.; DENNY, F. W.; THOMPSON, G. W.; ALLISON, A. C.; MARDH, P. A. Isolation of mycoplasmas from lungs by a perfusion technique. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 158, p. 9-15, 1972.

TER LAAK, E. A.; TULLY, J. G.; NOORDGRAAF, H. A.; ROSE, D. L.; CARLE, P.; BOVÉ, J. H.; SMITH, M. A. Recognition of *Mycoplasma canis* as part of mycoplasmal flora of the bovine respiratory tract. **Veterinary Microbiology**, v. 34, p. 175-189, 1993.

THOMSON, C.; HILL, A. The direct inoculation of *Mycoplasma pulmonis* into rat lungs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 82, n. 1, p. 81-85, 1972.

TIMENETSKY, J. Micoplasmas e pesquisa biomédica. **Laes & Haes**, v. 21, p. 92-102, 1999.

TIMENETSKY, J.; DE LUCA, R. R. Detection of *Mycoplasma pulmonis* from rats and mice of São Paulo, Brazil. **Laboratory Animal Science**, v. 48, p. 210-13, 1998.

TIMENETSKY, J.; SUMMA, M. E. L.; DE LUCA, R. R. *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma arthritidis* in rodents from animal houses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, p. 45-50, 1992.

TRAM, C.; GUILLON, J. C.; CHOUROULINKOV, I. Isolation of mycoplasma from rat fetus by aseptic cesarean section. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses filiales**, v. 164, n. 12, p. 2470-2471, 1970.

TULLY, J. G. Biology of rodent mycoplasmas. In: BHATT, P. N.; JACOBY, R. O.; MORSE III, H. C.; NEW, A. E. (Eds.). **Viral and mycoplasmal infections of laboratory rodents: effects on biomedical research**. Orlando, Fla.: Academic Press, 1986. p. 63-86.

TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes, In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Eds.). **Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology**, Molecular characterization. San Diego: Academic Press, 1995. v. 1, p. 33-40.

TULLY, J. G. Mollicute-host interrelationships: current concepts and diagnostic implications. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Eds.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**, Diagnostic Procedures. San Diego: Academic Press, 1996. v. 2, p. 1-21.

TVEDTEN, H. W.; WHITEHAIR, C. K.; LANGHAM, R. F. Influence of vitamins A and E on gnotobiotic and conventionally maintained rats exposed to *Mycoplasma pulmonis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 163, n. 6, p. 605-612, 1973.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; MELCHERS, W. J. G.; WILLEMSE, H. F.; KISSING, J.; GALAMA, J. M. D.; VAN DER LOGT, J. T. M. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in experimental infected laboratory rats by 16S rRNA amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 524-527, 1993.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN DER LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; QUINT, W. G. V.; NIESTERS, J. M.; GALAMA, J. M. D.; MELCHERS, W. J. G. Genus and Species-Specific Identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA Amplification. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2606-2615, 1992.

VEILLEUX, C.; RAZIN, S. MAY, L. H. Detection of mycoplasma infection by PCR. In: **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**, Diagnostic Procedures. San Diego: Academic Press, Inc., 1996. v. 2, p. 431-38.

VERDIN, E.; SAILLARD, C.; LABBÉ, A.; BOVÉ, J. M.; KOBISCH, M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washing from pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p. 31-40, 2000.

WAITES, K. B.; CRABB, D. M.; DUFFY, L. B. Comparative *in vitro* susceptibilities and bacterial activities of investigational fluorquinolone ABT-492 and other microbial agents against human mycoplasmas and ureaplasmas. **Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 3973-3975, 2003.

WAITES, K. B.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; MARRIOTT, P. A.; DAVIS, R. O.; CASSELL, G. H. Isolation of *Acholeplasma oculi* from human amniotic fluid in early pregnancy. **Current Microbiology**, v. 15, p. 325-327, 1987.

WARD, J. R.; COLE, B. C. Mycoplasmal infections of laboratory animals. In: SHARP, J. T. (Ed.). **The role of mycoplasmas and L forms of bacteria in disease**. Springfield, Illinois: Charles C. Thomas Publishers, 1970. p. 212-239.

WASHBURN, L. R. Experimental models of arthritis. In: TULLY, J. G.; RAZIN, S. (Eds.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**, Diagnostic Procedures. San Diego: Academic Press, 1996. v. 2, p. 349-359.

WHITFORD, H. W.; LINGSWEILER, S. W. Canine, feline and equine mycoplasmas. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUSCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Eds.). **Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis**. Iowa: Iowa State University Press, 1994. p. 134-140.

WHITTLESTONE, P.; LEMCKE, R. M.; OLDS, R. J. respiratory disease in a colony of rats II. Isolation of *Mycoplasma pulmonis* from the natural disease, and the experimental disease induced with a cloned culture of this organisms. **The Journal of Hygiene**, v. 70, p. 387-409, 1972.

YETCHOURON, A.; LEFEBVRE, J.; ROBSON, H. G.; ROSE, D. L. TULLY, J. G. Fatal septicemia with *Mycoplasma arginini*: a new human zoonosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, p. 434-438, 1992.