RENATA LOPES NETO

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE MICOPLASMA
NO TRATO UROGENITAL, OROFARINGE E
CONJUNTIVA DE MACACO (*CEBUS*)**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2007

RENATA LOPES NETO

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE MICOPLASMA NO TRATO
UROGENITAL, OROFARINGE E CONJUNTIVA DE MACACO
(*CEBUS*)**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Microbiologia).

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador:
Prof. Dr. Jorge Timenetsky

São Paulo

2007

Aos meus pais, Nilza e Pedro, por sempre me incentivarem nos meus estudos e na minha formação, vocês são os meus primeiros mestres Ao meu irmão Rodrigo pela amizade e carinho. E ao meu marido, Thiago, que sempre confiou na minha capacidade de concretizar este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha existência e força no dia-a-dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Timetsky, pela oportunidade e credibilidade no desenvolvimento deste trabalho.

A minha família, pelo amor, pela educação e ensinamentos de honestidade e caráter imprescindíveis na vida de qualquer pessoa.

Ao meu marido Thiago pelo amor, apoio, paciência, incentivo e confiança em todos os momentos da concretização deste trabalho.

A Celminha pelos ensinamentos e contribuições diária imprescindíveis para a realização deste trabalho, e pela amizade conquistada durante este tempo.

Ao Lucas por ter aberto os meus caminhos e despertado o interesse no estudo dos micoplasmas. Obrigada pelos conselhos, carinho e amizade durante esta nossa longa jornada.

A Nany e ao Mau pela paciência e ensinamento importantes utilizados neste trabalho. Obrigada pela companhia e apoio nas madrugadas no laboratório.

Ao amigos do laboratório Nany, Mau, Lucas, Mel, Ana Márcia, Magda, Júnior, Juliana, Elena, Juliana e Marcos, pela ajuda e convívio de aprendizagem durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Jacinta pelo empenho e apoio para obtenção das amostras utilizadas neste trabalho. E pela amizade.

Aos Médicos Veterinários Aziz O. Medina e Diego L. Faria, ao Biólogo Luis Sanphilipo e ao Professor Elerson Gaetti Jardim Júnior pelas amostras decididas, sem o apoio de vocês este trabalho não teria se concretizado.

Aos funcionários da sala de esterilização do ICB II.

Aos grandes amigos para todo o sempre Lídia, Rose, Thiago, Lucas e Ana Magda.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pelo auxílio na preparação deste trabalho.

A Alice pela paciência e atendimento na secretaria.

As funcionárias Aninha e Naide, da secretaria de Microbiologia do ICB II.
Muito Obrigada.

Aos amigos da E. E. Eng. Argeo Pinto Dias.

Ao colegas do Colégio Lima Guimarães.

A Mazé (diretoria Sul-3), do bolsa Mestrado, pela paciência na entrega dos relatórios.

A Secretaria da Educação do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa Mestrado.

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

*“Há homens que lutam um dia e
são bons.
Há outros que lutam um ano e
são melhores.
Há os que lutam muitos anos e
são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a
vida.
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertolt Brecht

RESUMO

NETO, R.L. **Estudo da frequência de micoplasma no trato urogenital, orofaringe e conjuntiva de macacos silvestres.** 84 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Pesquisou-se a frequência de *Mollicutes* na orofaringe, conjuntiva e trato urogenital de 58 macacos. Na orofaringe detectou-se *Mollicutes* em 55,17 % e *Ureaplasma spp* em 43,10%. As espécies identificadas nesta região foram: *M. arginini* (43,10%), *M. salivarium* (41,37%), e *M. pneumoniae* (18,96%). No trato genital detectou-se *Mollicutes* em 27,58% sendo identificado *M. arginini* em 8,62%, *A. laidlawii* em 1,72 % e *Ureaplasma spp* em 32,75%. Na conjuntiva detectou-se *Mollicutes* em 29,31 % e *A. laidlawii* em 1,72 %. Os cultivos apresentaram limitações pelo alto índice de contaminação e obtiveram-se apenas dois isolamentos da conjuntiva. As espécies detectadas constituem-se o achado inicial destas bactérias em macacos no Brasil.

Palavras-chave: *Mollicutes*; *Mycoplasma*; *Ureaplasma*; macacos; animais silvestres; PCR.

ABSTRACT

NETO, R.L. **Study of mycoplasma frequency in the urogenital tract, oropharynx, and conjunctiva of wild monkeys.** 84 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The frequency of *Mollicutes* in oropharynx, conjunctiva, and urogenital tract were accessed in 58 monkeys. In oropharynx, *Mollicutes* and *Ureaplasma* spp were detected in 55.17% and 43.01% of the samples, respectively. The identified species in this site included: *M. arginini* (43.10%), *M. salivarium* (41.37%), and *M. pneumoniae* (18.96%). In the urogenital tract, *Mollicutes* were detected in 27.58% of the samples; including *M. arginini* (8.62%), *A. laidlawii* (1.72%) and *Ureaplasma* spp (32.75%). In the conjunctiva, *Mollicutes* were detected in 29.31% and *A. laidlawii* in 1.72% of the animals. *Mollicutes* culture showed technical limitations because of the high level of contamination and only two isolates were obtained; both from conjunctival sites. The *Mollicute* specie surveillance of this study provided initial and new insights about these bacteria in Brazilian monkeys.

Palavras-chave: *Mollicutes*; *Mycoplasma*; *Ureaplasma*; monkeys; wild animals; PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Seqüência completa do gene 16S rRNA de <i>Mycoplasma primatum</i> . As seqüências em destacadas correspondem aos “primers” PR1 e PR2.....	40
Figura 2.	Seqüência completa do gene 16S rRNA de <i>Mycoplasma lipophilum</i> . As seqüências em destacadas correspondem aos “primers” L1 e L2.....	41
Figura 3.	Colônias de <i>Mycoplasma</i> spp em meio SP4, isoladas de amostra conjuntiva de macaco sadio. Aumento de 100X.....	52
Figura 4.	Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando “primers” LI1/LI2, a partir do DNA <i>M. lipophilum</i> . Análise da variação da temperatura de anelamento. Colunas 1 a 11: variação de 50 a 60°C em escala de 1 – 1°C; coluna 12: controle negativo das reações com água ultrapura estéril; coluna 13: padrão de peso molecular de DNA – 100 pb.....	53
Figura 5.	Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR com “primers” específicos para <i>M. primatum</i> PR1/PR2 a partir do DNA extraído de outras espécies de micoplasmas. Coluna 1 a 13: amostras de outras espécies de micoplasma; coluna 14: controle positivo das reações de <i>M. primatum</i> ; coluna 15: controle negativo das reações com água ultrapura estéril; 16: padrão de peso molecular de DNA – 100 pb.....	54
Figura 6.	Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR com “primers” específicos para <i>M. orale</i> UNI/ORA5 a partir do DNA extraído de amostras de “swab” orofaríngeo. Coluna 1 a 13: amostras “swab” orofaríngeo; coluna 14: controle positivo das reações de <i>M. orale</i> ; 15: coluna:padrão de peso molecular de DNA – 100 pb; 16: controle negativo das reações com água ultrapura estéril.....	56
Figura 7.	Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR com “primers” específicos para <i>M. arginini</i> MAGF/GP4R a partir do DNA extraído de amostras de “swab” orofaríngeo. Coluna 1 a 13: amostras “swab” orofaríngeo; coluna 14: controle positivo das reações de <i>M. arginini</i> ; coluna 15: controle negativo das reações com água ultrapura estéril: coluna 16: padrão de peso molecular de DNA – 100 pb.....	56
Figura 8.	Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR com “primers” para o gênero <i>Ureaplasma</i> U4/U5 a partir do DNA extraído de amostras de “swab” urogenital. Coluna 1 a 9: amostras “swab” urogenital; coluna 10: controle positivo das reações de <i>Ureaplasma</i> ; coluna 11: controle negativo das reações com água ultrapura estéril; 12: padrão de peso molecular de DNA – 100 pb.....	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	“Primers” específicos para detecção de <i>M. primum</i> , sequência, tamanho do produto amplificado esperado.....	38
Quadro 2.	“Primers” específicos para detecção de <i>M. lipophilum</i> , sequência, tamanho do produto amplificado esperado.....	38
Quadro 3.	“Primers” para a detecção de microrganismos da Classe dos <i>Mollicutes</i> , sequências e tamanho do produto amplificado esperado.....	42
Quadro 4.	“Primers” para a detecção de microrganismos do gênero <i>Ureaplasma</i> , sequências e tamanho do produto amplificado esperado.....	43
Quadro 5.	“Primers” para a detecção de <i>Ureaplasma urealyticum</i> , sequências e tamanho do produto amplificado.....	44
Quadro 6.	“Primers” para a detecção de <i>M. arginini</i> e <i>M. salivarium</i> , sequências e tamanho do produto amplificado esperado.....	45
Quadro 7.	“Primers” para a detecção de <i>M. fermentans</i> , <i>M. orale</i> e <i>A. laidlawii</i> , sequências e tamanho do produto amplificado esperado.....	46
Quadro 8.	“Primers” para a detecção de <i>M. genitalium</i> , sequências e tamanho do produto amplificado esperado.....	47
Quadro 9.	“Primers” para a detecção de <i>M. pneumoniae</i> , sequências e tamanho do produto amplificado esperado.....	48
Quadro 10.	“Primers” para a detecção de <i>M. hominis</i> sequências e tamanho do produto amplificado.....	49
Quadro 11.	“Primers” para a detecção de <i>M. conjunctivae</i> , sequências e tamanho do produto amplificado esperado.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Localização, espécies, hábitat, contato entre eles, número, sexo e amostras clínicas dos animais estudados.....	32
Tabela 2.	Número de reações positivas na PCR genérica para a detecção de microrganismos da Classe <i>Mollicutes</i> e Gênero <i>Ureaplasma</i> a partir de DNA extraído de amostras de “swab” orofaríngeo de macacos.....	55
Tabela 3.	Número de reações positivas na PCR espécie-específica a partir de DNA extraído de amostras de “swab” orofaríngeo de macacos.....	57
Tabela 4.	Número de reações positivas na PCR genérica para a detecção de microrganismos da Classe <i>Mollicutes</i> e Gênero <i>Ureaplasma</i> a partir de DNA extraído de amostras de “swab” urogenital de macacos.....	58
Tabela 5.	Número de reações positivas na PCR espécie-específica a partir de DNA extraído de amostras de “swab” urogenital de macacos.....	60
Tabela 6.	Número de reações positivas para micoplasmas na PCR genérica para a Classe <i>Mollicutes</i> e espécie-específica a partir de DNA extraídos de amostras de “swab” da conjuntiva de macacos.....	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Animais silvestres doenças emergentes.....	16
1.2 Características gerais dos <i>Mollicutes</i>	19
1.3 Micoplasmas em Macacos e Humanos	23
1.4 Diagnósticos Laboratorial.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Caracterização dos animais e seu manuseio, e locais de coleta.....	31
3.2 Cepas de referência.....	31
3.3 Meios de Cultivo.....	33
3.3.1 Meio Líquido/sólido SP4.....	33
3.3.2 Meios Líquido U _B	34
3.3.3 Meios Sólido U _B	35
3.4 Coleta de amostra clínica.....	36
3.5 Semeadura e Identificação.....	36
3.5.1 Subcultivo das amostras de referência para <i>Mollicutes</i>	37
3.6 Extração do DNA das amostras clínicas.....	37
3.7 Oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) para a detecção de <i>M. primum</i> e <i>M. lipophilum</i>	37
3.7.1 Padronização da PCR <i>M. primum</i> e <i>M. lipophilum</i>	39
3.7.2 Teste de especificidade e sensibilidade da PCR	39
3.7.3 Parâmetros definidos na PCR	40
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	41
3.8.1 PCR genérica para a Classe dos <i>Mollicutes</i>	41
3.8.2 PCR para detecção de microrganismos pertencentes ao gênero <i>Ureaplasma</i>	42
3.8.3 PCR espécie-específica para detecção de <i>Ureaplasma urealyticum</i>	43
3.8.4 PCR espécie-específica para detecção de <i>Mycoplasma arginini</i> e <i>M. salivarium</i>	44
3.8.5 PCR espécie-específica para detecção de <i>Acholeaplasma laidlawii</i> ,	

<i>Mycoplasma fermentans</i> e <i>M. orale</i>	45
3.8.6 PCR espécie-específica para detecção de <i>Mycoplasma genitalium</i> .	47
3.8.7 PCR espécie-específica para detecção de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	48
3.8.8 PCR espécie-específica para detecção de <i>Mycoplasma hominis</i>	49
3.8.9 PCR espécie-específica para detecção de <i>Mycoplasma conjunctivae</i>	50
3.9 Detecção do Produto Amplificado.....	51
3.10 Análise estatística.....	51
 4. RESULTADOS.....	 52
4.1 Cultivo das amostras do trato orofaríngeo, urogenital e conjuntiva dos animais para a detecção de micoplasmas.	52
4.2 Desenvolvimento da técnica de PCR para a detecção de <i>M. lipophilum</i> e <i>M. primum</i>	53
4.2.1 Concentração de MgCl ₂	53
4.2.2 Temperatura de anelamento.....	53
4.2.3 Teste de especificidade.....	54
4.2.4 Teste de sensibilidade.....	54
4.3 Detecção de <i>Mollicutes</i> em amostras da orofaringe, de macacos por meio da PCR utilizando “primers” genéricos e espécie-específicos.....	55
4.4 Detecção de micoplasmas em amostras do trato urogenital de macacos por meio da PCR utilizando “primers” genéricos e espécie-específicos.....	58
4.5 Detecção de micoplasmas em amostras de “swab” coletados da conjuntiva de macacos por meio da PCR utilizando “primers” genéricos e “primers” espécie-específicos.....	61
4.6 Análise Estatística.....	61
 5. DISCUSSÃO.....	 63
 6. CONCLUSÃO.....	 71
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Animais silvestres doenças emergentes

Os dados epidemiológicos confirmam que os animais silvestres são potenciais transmissores, diretos ou indiretos, de agentes infecciosos ao homem, animais domésticos, cativeiro e animais de laboratório. A aproximação dos animais selvagens a hospedeiros incomuns ao seu hábitat contribui no aumento do espectro de microrganismos capazes de causarem doenças novas ou pouco freqüentes em humanos ou animais. O estudo dos animais silvestres possui grande interesse nas pesquisas em medicina veterinária principalmente quando considerados como reservatórios de patógenos. Infecções transmitidas por animais silvestres ao homem e animais domésticos foram descritas principalmente no que se refere à saúde pública e na agropecuária (SAINSBURY et al. 2001; RACANIELLO, 2004; SIMPSON, 2005; ARTOIS et al., 2006; CHOMEL et al., 2007).

Doenças infecciosas emergentes são aquelas de ampla distribuição geográfica, e recentemente encontradas em novos hospedeiros sendo atualmente causadas por novos patógenos. O fator responsável pela emergência dessas doenças é a adaptação do microrganismo ao hospedeiro não habitual. Com isso, a pressão seletiva favorece a sobrevivência de patógenos adaptados às novas condições. Relatos sobre o aumento na incidência dessas doenças pode ser resultado da análise de banco de dados gerados de notificações compulsórias e outras fontes da vigilância epidemiológica (DASZAK et al., 2001). Certas populações de animais selvagens estão associadas como reservatórios de patógenos na emergência de doenças infecciosas em animais de diferentes espécies (DASZAK et al., 2000; DASZAK et al., 2001; BENGIS et al., 2004).

As epidemias emergentes em animais silvestres estão classificadas em três categorias. O primeiro grupo consiste de microrganismos que recentemente acometem animais silvestres suscetíveis. Ocorre dispersão intensa destes microrganismos pelos hospedeiros considerando-se um “grupo epidêmico virgem”. O segundo grupo de patógenos emergentes constitui-se do espécie-específico que se dissemina de maneira alterada para outros hospedeiros devido a alterações do meio ambiente, do parasita e hospedeiro. O terceiro grupo constitui-se da associação das anteriores (DOBSON e FOULFOPOULOS, 2001).

As similaridades entre humanos e primatas não humanos na suscetibilidade a patógenos tornou estes animais modelos ideais no estudo das doenças emergentes. Durante o século XX, os laboratórios que trabalhavam com primatas em cativeiro elucidaram o ciclo do parasita e a patogenia de alguns agentes infecciosos, como o hantavírus B e *Mycobacterium* spp, o que auxiliaram o desenvolvimento de fármacos e vacinas (WOLFE et al.,1998).

Os primatas do Novo Mundo, entre eles os do gênero *Cebus*, têm recebido crescente interesse dos pesquisadores devido ao seu menor tamanho e facilidade de contenção (VILA NOVA, 2006). O gênero *Cebus* pertence ao grupo dos primatas do Novo Mundo (platirrinos). Este gênero pertence à família Cebidae e é conhecido popularmente como “macaco-prego”, possui espécies com pronunciada destreza manual, alta sociabilidade (vivem em grupos de ambos os sexos com domínio de um casal) e dieta onívora (DEFLER, 1979; REESE e OPPENHEIMER, 1981; AURICCHIO, 1995; NOWAK, 1999; SUSSMAN, 2000; DEFLER, 2004; VERONA e PISSINATTI, 2006). Todas as espécies de platirrínios estão incluídas na lista da Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), em seu apêndice II, o que significa que apesar de nem todas estarem

diretamente ameaçadas de extinção, todas possuem algum grau de vulnerabilidade. Excetuando o *Cebus kaapori* na Amazônia e o *Cebus xanthosternus* na Mata Atlântica, e que estão seriamente ameaçadas, as demais espécies de *Cebus* acham-se em razoável condição de pressão antrópica sobre o hábitat (VERONA e PISSINATTI, 2006).

Algumas espécies de parasitos intestinais como: *Giardia intestinalis*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica* que ocorrem nas populações de primatas silvestres podem ser patogênicos aos humanos e vice-versa (LEENDERTZ et al., 2006). A crescente exploração e ocupação humana das florestas nativas potencializam a transmissão e ocorrência de doenças não freqüentes, raras ou mesmo desconhecidas entre populações humanas e primatas silvestres (LILY, 2003).

As doenças crônicas associadas às micoplasmoses são raramente reconhecidas como doenças emergentes em animais silvestres (BROWN, 2005). Diversos micoplasmas estão associados a animais em todas as classes de vertebrados. Estas bactérias, comumente, são espécie-específicas, porém algumas apresentam a capacidade de infectar diferentes hospedeiros (RAZIN, 1995). *Mycoplasma felis*, por exemplo, foi detectado em líquido sinovial humano de uma artrite em paciente imunossuprimido (BONILLA et al., 1997). *Mycoplasma gallisepticum* é responsável por importantes perdas econômicas causando doenças respiratórias na avicultura, mas já foi descrito acometendo conjuntivite em aves silvestres (WILLIAMS et al., 2002).

1.2 Características gerais dos *Mollicutes*

O termo micoplasma, informalmente, designa os gêneros da Classe *Mollicutes*, (*Mollis*=mole *cútis*=pele) pertencente à divisão *Tenericutes*, uma das quatro divisões do Reino *Procaryotae*. Recentemente algumas antigas riquetsias e outras bactérias, de taxonomia indefinida, devido à similaridade genômica, foram incluídas aos *Mollicutes*. Estes microrganismos compõem atualmente cinco ordens; (*Entomoplasmatales*, *Acholeapasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incetae sedis*), seis famílias (*Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeapasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* e *Erysipelothrichaceae*) e 12 gêneros (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeoplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelothrix*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium*). Os mollicutes compreendem aproximadamente por 200 espécies, distribuídas entre humanos, animais, insetos e plantas. Atualmente o termo genérico destes microrganismos é designado de mollicute e micoplasma apenas para as espécies do gênero *Mycoplasma*. (RAZIN, 1992). Habitualmente, esses microrganismos colonizam superfícies de mucosa e a maioria é considerada não invasiva (YODER, 1991; GRZESKO et al., 2006).

O primeiro isolamento de micoplasma foi descrito por Norcard e Roux, em 1898, conhecido como agente da pleuropneumonia bovina, doença já conhecida e descrita há mais de um século na Europa e África. Posteriormente, foram relatados, por outros pesquisadores, microrganismos semelhantes, isolados de humanos e animais denominados de PPLO – “Pleuropneumonia-Like Organisms” (RAZIN, 1992).

Os mollicutes são as menores bactérias já descritas e os únicos procariotos a possuírem colesterol na constituição da membrana celular. A ausência da parede celular faz com que estes microrganismos sejam naturalmente resistentes a antibióticos que interferem na síntese da parede (RAZIN e TULLY, 1983; NEIMARK, 1986).

Estas bactérias geralmente possuem forma elíptica a esférica e aproximam-se das dimensões dos maiores vírus (0,2 a 0,4 μm). A forma helicoidal ocorre apenas nos Spiroplasmas, originários de plantas ou insetos, podendo atingir aproximadamente 100 μm . Ocorre também a forma filamentosa, morfologia que confere o termo *myco* de *myces*=filamento. Esta forma é multinucleada, podendo ocorrer em determinados momentos da multiplicação, pela falta de sincronia entre a septação na divisão celular e a replicação do DNA (BASEMAN e TULLY, 1997).

Com exigências nutricionais diferenciadas, os micoplasmas, em meio de cultura sólido formam usualmente colônias em forma de “ovo frito”, com 50 a 500 μm de diâmetro, sendo visualizadas com o auxílio de microscópio estereoscópio. No meio líquido o crescimento geralmente não causa turvação provocando somente alteração no pH (RAZIN, 1995).

Os micoplasmas são desprovidos de flagelos, entretanto, esses microrganismos podem exibir motilidade por deslizamento sobre superfícies inertes ou apresentarem contração celular como descrito nos spiroplasmas (RAZIN, 1992).

Os mecanismos de patogenicidade dos micoplasmas são complexos, a célula hospedeira infectada passa a fornecer ou competir com este microrganismo pelos mesmos substratos, tais como: precursores de lipídeos, purinas e pirimidinas recém formadas. Alguns micoplasmas têm capacidade de invadir e modular a resposta

imune do hospedeiro, principalmente pela diversidade e variação antigênica das proteínas da superfície. Incluem-se entre os eventos de virulência a aderência à célula hospedeira e, posterior produção de metabólitos primários capazes de interferir no metabolismo da célula hospedeira. A patogenicidade destes microrganismos está relacionada com atividades biológicas de compostos como adesinas, receptores de nutrientes, polissacarídeos e metabólitos intermediários (TRYON e BASEMAN, 1992). Acredita-se que estes compostos, às vezes concentrados em estruturas polares especializadas “blebs”, em algumas espécies, estejam envolvidas no mecanismo de penetração em células hospedeiras, processo descoberto inicialmente em *Mycoplasma penetrans* específico e origem humana (LO et al., 1992).

Os mollicutes em geral apresentam o menor genoma conhecido entre os procariotos. Estas bactérias podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o tamanho do genoma; um composto pelos gêneros *Mycoplasmas* e *Ureaplasma*, que possui a aproximadamente 580 a 1350 Kpb, e o outro formado pelos gêneros *Acholeaplasma*, *Spiroplasma* e *Anaeroplasma*, com 790 a 2200 Kpb. O tamanho do genoma estabelece restrições quanto ao número de proteínas sintetizadas, limitando os números de vias metabólicas. Esta limitação conseqüentemente estabelece dependência de nutrientes para o seu crescimento “in vitro”, prejudicando o isolamento (MILES e NICHOLAS, 1998). Os meios de cultivo são complexos e contém soro animal, fonte de ácido graxo, aminoácidos, nucleotídeos e colesterol, que são necessários à síntese da membrana (LEMCKE e BURROWS, 1980). Os genomas são caracterizados por possuírem baixo conteúdo de guanina e citosina (G + C), variando de 24 a 33 mol%, com exceção de poucas espécies, que possuem cerca de 41 mol% (RAZIN, 1992).

Quanto ao seu metabolismo, os micoplasmas, estão divididos basicamente em fermentadores e não-fermentadores. Os fermentadores produzem ácidos através da metabolização de glicose e de outros carboidratos, acidificando o meio de cultivo; e os não-fermentadores possuem a via da arginina-deidrolase para obtenção de ATP, causando a alcalinização de meio de cultivo (RAZIN, 1978, 2004). Poucas espécies realizam as duas vias metabólicas, entretanto, quando isto ocorre a primeira a ser usada é a glicólise e os ácidos produzidos mascaram a alcalinização produzida pela hidrólise da arginina. As espécies do gênero *Ureaplasma* necessitam de uréia para produzir ATP, hidrolisando este composto e produzindo amônia (BASEMAN e TULLY, 1997; RAZIN, 2004). Os ciclos do ácido carboxílico, das quinonas e citocromos não foram encontrados nos micoplasmas, bem como não ocorre a síntese de ácido fólico, tornando-se naturalmente resistentes também as sulfonamidas (MILES, 1992; POLACK et al., 1997).

A maioria das espécies conhecidas de *Mollicutes* é de origem animal e, portanto, a relação parasito-hospedeiro é bastante diversa. Espécies dos gêneros *Acholeaplasma*, *Mycoplasma* e *Ureaplasma* têm sido isoladas de animais doentes, mas a patogenicidade destas bactérias ainda é pouco conhecida e às vezes controversa. As espécies mais estudadas estão envolvidas em doenças respiratórias, genitais, artrites e conjuntivites (SIMECKA et al., 1992). Infecções causadas por ureaplasmas e micoplasmas nos animais de produção possuem importância histórica na micoplasmologia, acarretando sérios problemas econômicos. Estas bactérias também infectam animais silvestres, de experimentação e domésticos (RAZIN, 1995).

1.3 Micoplasmas em Macacos e Humanos

Os macacos e humanos têm em comum, aproximadamente 150 espécies bacterianas, incluindo alguns *Mollicutes*, e outros parasitos. Os macacos podem transmitir esses microrganismos, inclusive as espécies patogênicas, para os humanos durante o contato com pesquisadores, ecoturistas, indivíduos com propósito de captura e comércio ilegal (DOBSON e FOUFOPOULOS, 2001).

A maioria das espécies de micoplasmas isoladas em humanos têm sido descobertas em primatas não-humanos. Devido a este fato, foi sugerido por Del Guidice e colaboradores (1969) classificar essas espécies como de primatas, englobando os humanos e os primatas não-humanos. Entretanto algumas informações sobre a microbiota de micoplasmas têm sido obtidas por meio de estudos com animais de cativeiro, porém a possibilidade de infecções provenientes dos manipuladores destes animais não é considerada (WHITHEAR, 2001).

Mycoplasma hominis e *Mycoplasma salivarium* foram os primeiros isolado identificados em macaco-verde (*Cercopithecus aethiops*). O estudo inicial da microbiota de micoplasmas em macacos foi descrita por Del Guidice e colaboradores em 1969. Entre os 70 micoplasmas isolados, 64 (94%) eram comuns aos humanos como *M. orale*, *M. salivarium* e *M. fermentans*.

A infecção por micoplasmas em humanos e macacos é caracterizada usualmente pela persistência do agente no hospedeiro, no qual ocorre imunossupressão e atividades potencializadas pela infecção simultânea por outros agentes infecciosos. Esta particularidade pode também comprometer e ocasionar resultados falsos no diagnóstico laboratorial ou nas experimentações com esses animais. A similaridade entre macacos e humanos, mediante a resposta imunológica a infecção por

micoplasmas, fazem destes animais modelos experimentais indispensáveis nos estudos de infecções por estas bactérias em humanos (DZHIKIDZE e KRYLOVA, 2001).

Diferentes aspectos das infecções causadas por micoplasmas em humanos foram estudados em animais de laboratórios. Os macacos, particularmente chimpanzés, têm sido reconhecidos como o melhor modelo de estudo das infecções humanas. *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. arthritidis*, *U. urealyticum* e *M. genitalium* foram inoculados e estudados em chimpanzés na reprodução de infecções respiratórias, urogenitais ou articulares e apresentaram resultados semelhantes às infecções naturais em humanos (KRYLOVA et al., 2001).

Na microbiota do trato respiratório superior de primatas não-humanos saudáveis, foram detectados alguns *Mollicutes*. Entre as espécies já isoladas incluem-se *Mycoplasma buccale*, *M. hominis*, *M. indienne*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. primum*, *M. salivarium*, e *Ureaplasma urealyticum*. No entanto, alguns isolados dos gêneros *Acholeplasma* spp, *Mycoplasma* spp e *Ureaplasma* spp não foram caracterizados (BROWN et al., 2005).

Koshimizu et al. (1975) isolaram micoplasmas em 16% de 215 amostras de “swab” nasal, oral, uretral, vaginal e retal de primatas não-humanos, aparentemente saudáveis, provenientes da Ásia, África e América do Sul.

Na Rússia 15 isolados de micoplasmas foram obtidos de primatas das espécies *Papio hamadryas* com leucemia e de *Macacus rhesus* saudável, sendo identificados como *Acholeplasma laidlawii*, *M. arthritidis*, *M. cynomologus* e *M. orale* (SMIRNOVA et al., 1975).

As infecções urogenitais que acometem os primatas não-humanos usados como modelos experimentais podem ser causadas por micoplasmas, que resulta em problemas na reprodução desses animais em cativeiro. *U. urealyticum*, *M. hominis* e *M. genitalium* foram identificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de “swab” vaginal, cervical, endometrial e uretral de primatas não-humanos. Estas espécies são rotineiramente encontradas em primatas de laboratório, mas há outras ainda não identificadas (SHIBATA et al., 1986; SCHOEB et al., 1997).

Tully e et al. (1981) isolaram uma espécie nova de micoplasma da uretra em dois de 13 homens com uretrite não-gonocócica. Posteriormente, este microrganismo recebeu o nome de *Mycoplasma genitalium* devido a sua localização no tecido do hospedeiro. Entretanto, após 25 anos de seu descobrimento sua patologia ainda não é bem conhecida. Seu diagnóstico é difícil, pois seu crescimento é lento em meios de cultivo, sendo inibido por *M. hominis* e *Ureaplasma* sp, espécies freqüentemente encontradas no trato urogenital. Devido às dificuldades encontradas no seu cultivo “in vitro” o diagnóstico de *M. genitalium* é fundamentado em técnicas moleculares como a PCR. Vários estudos realizados em amostras coletadas de homens com uretrite não-gonocócica detectaram por meio da PCR *M. genitalium* em 15 a 25% das amostras. Nas mulheres, *M. genitalium* tem sido associado com cervicites, doenças inflamatórias pélvicas e infertilidade (MOLLER et al., 1984; BLANCHARD et al., 1993; GÜBELIN et al., 2006).

Além disso, *M. genitalium* tem sido detectado na cavidade nasofaríngea de indivíduos com pneumonia (RIVERA-TAPIA et al., 2001), fluido sinovial de pacientes com artrite reativa relacionada a Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs). Este micoplasma foi também detectado em mulheres com doença inflamatória pélvica ou

salpingite e, quando associado ao *M. pneumoniae* em pacientes imunodeprimidos, ocasiona sinusite, cistite e osteomielite. (BASEMAN e TULLY, 1997; TAYLOR-ROBINSON e FURR, 1998).

O *Mycoplasma hominis* é um agente infeccioso humano do trato urogenital masculino e feminino. Este microrganismo está associado a uretrites, vaginites e cervicites em humanos. A colonização do trato genital feminino por este agente pode resultar na infecção do feto ou do recém-nascido, endometrite e septicemia pós-parto. *M. hominis* e *U. urealyticum* foram cultivados do líquido amniótico de gestantes na 16ª semana de gravidez. Ambos os microrganismos foram isolados em casos de abortos espontâneos (GALLIA et al., 1995).

O *Mycoplasma conjunctivae* é um agente infeccioso capaz de causar infecções oculares, como a ceratoconjuntivite, em animais domésticos e selvagens (GIACOMETTI et al., 2002). Exames histológicos de lesões oculares associadas a conjuntivite por micoplasmas evidenciaram as variações no tecido ocular, incluindo córnea, úvea anterior e a pálpebras (DHONDT et al., 2005).

O *Mycoplasma pneumoniae*, considerado um patógeno não-invasivo, coloniza a superfície da mucosa do trato respiratório. Este agente pode causar pneumonia atípica com maior ocorrência em crianças e jovens adultos (LEITH et al., 1983). Esta espécie é considerada a mais virulenta entre as espécies de micoplasmas de origem humana sendo importante na saúde pública (CHANOCK, 1965). Descrito pela primeira vez por Eaton et al. (1944) este agente foi isolado do escarro de um paciente com pneumonia atípica.

M. fermentans passou a ser mais estudado na década de 80 devido a evidências que este microrganismo poderia ser um mediador importante ou co-fator no

desenvolvimento da AIDS (LO et al., 1989; SAILLARD, 1990). Posteriormente, com o desenvolvimento de técnicas moleculares como a PCR verificou-se que este micoplasma não estava associado a AIDS, podendo ser um patógeno oportunista mesmo em indivíduos não portadores do vírus HIV (BLANCHARD e BEBEAR, 2002). *M. fermentans* pode ser detectado em indivíduos sadios ou doentes nos tratos urogenitais e respiratórios, inferiores e superiores (TULLY, 1993).

Alguns micoplasmas como, *Mycoplasma salivarium* e *M. orale*, pertencem à microbiota da cavidade oral. Estas espécies estão relacionadas com infecções na gengiva podendo ser isoladas da cavidade periodontal e placa dental. *M. buccale*, *M. lipophilum*, *M. fermentans* e *Acholeplasma laidlawii*, através de testes bioquímicos também foram detectados na cavidade bucal humana (WATANABE et al., 1986).

O *M. primatum* foi caracterizado por Del Guidice e colaboradores em 1971, pois foi considerado uma espécie distintas quando realizados testes sorológicos, comparação do cultivo e análises bioquímicas das conhecidas até aquele momento das espécies de *Mycoplasma* e *Acholeaplasma*. Posteriormente, esta espécie foi isolada por Uusküla e Kohl (2002) em amostras coletadas do trato urogenital de humanos, porém não foram consideradas como patógenas.

1.4 Diagnósticos Laboratorial

O diagnóstico laboratorial rápido e específico é necessário ao monitoramento das doenças causadas por micoplasmas. Na rotina laboratorial, a detecção do agente ainda é baseada no isolamento e sua caracterização fenotípica. A identificação geralmente é presuntiva, baseada principalmente, pela fermentação da glicose, hidrólise da arginina ou uréia, formação de filmes e manchas associada ao tipo e

origem de material clínico. A indisponibilidade comercial de anticorpos contra estes microrganismos limita o uso dos métodos sorológicos na identificação de antígenos ou anticorpos, como a inibição de crescimento e a imunofluorescência. Este procedimento é realizado apenas por laboratórios de pesquisa ou laboratórios especializados em algumas espécies de micoplasmas (GOLL, 1994).

As técnicas de diagnóstico molecular são usualmente indicadas ao uso rotineiro na detecção de microrganismos que geralmente crescem lentamente *in vitro*, requerem meio de cultura complexo, tempo de incubação prolongado, ou ainda não cultiváveis. A dificuldade no isolamento de amostras selvagens de mollicutes é justificada principalmente pela sua exigência nutricional, tempo de incubação e sensibilidade fora do nicho infeccioso. Desta maneira, indica-se o uso rotineiro das técnicas moleculares. (RAZIN et al., 1987).

A introdução da tecnologia da genética molecular no estudo dos micoplasmas tem auxiliado na classificação de novas espécies, no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e auxiliando no conhecimento dos processos pelos quais esses organismos alteram a integridade fisiológica das células hospedeiras (YAMAMOTO, 1994; DYBVIIG e VOELKER, 1996). Técnicas derivadas da PCR podem ser aplicadas, como a amplificação randômica polimórfica de DNA (RAPD), também chamada de reação em cadeia da polimerase, utilizando iniciadores ou “primers” arbitrários (AP-PCR) (WELSH e McCLELLAND, 1990; MENARD et al., 1992). Esta técnica permite a tipificação genotípica de organismos eucarióticos ou procarióticos, na detecção de polimorfismo em mapeamento de populações, nos estudos filogenéticos de microrganismos e no diagnóstico diferencial (MENARD et al., 1992; WELSH et al., 1995).

Métodos baseados na aplicação de tecnologia de DNA recombinante, tal como hibridização de DNA/RNA e reação em cadeia da polimerase (PCR) são aplicadas em diversos setores da pesquisa biomédica e no diagnóstico laboratorial. A tecnologia de hibridização de DNA tem sido aplicada com êxito também para detectar microrganismos patógenos com crescimento lento. No entanto, os métodos moleculares, não possuem ainda aplicação rotineira para diagnóstico laboratorial, principalmente pelo alto custo e complexidade técnica (HIRATA, 1997). A técnica da PCR foi estudada e aplicada previamente no Laboratório de Micoplasmas do ICB-USP, mostrando-se eficaz, específica e sensível na detecção rotineira de micoplasmas a partir de secreção vaginal de fêmeas bovinas (BUZINHANI, 2001).

2 OBJETIVOS

Isolamento de micoplasmas a partir de material clínico do trato urogenital, orofaringe e conjuntiva de *Cebus* em meios específicos para micoplasma e ureaplasma.

Desenvolvimento e padronização da PCR para o diagnóstico de *M. lipophilum* e *M. primum* em amostras coletadas de *Cebus*.

Utilização da PCR com “primers” genérico para detecção da Classe *Mollicutes* e do gêneros *Ureaplasma*

Utilização da PCR com “primers” espécie-específico para a detecção das espécies: *Acholeaplasma ladlawii*, *M. arginini*, *M. conjunctivae*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. lipophilum*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. primum*, *M. salivarium* e *U. urealyticum*.

Avaliação da frequência da Classe *Mollicutes* do gênero *Ureaplasma* e de algumas espécies detectadas pela PCR no material clínico coletado de macacos *Cebus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização dos animais e seu manuseio, e locais de coleta

Foram realizadas coletas em 58 macacos do gênero *Cebus* sadios de ambos os sexos, de vida livre ou em cativeiros, que mantinham contatos entre eles ou não, pertencentes ao mesmo local. As coletas foram realizadas no Parque Ecológico Tietê – São Paulo (11 animais), no Parque do Rivieira – São Paulo (23 animais), Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) – campus de Araçatuba (18 animais) e CETAS – Manaus/AM (06 animais) (Tabela 1).

Os macacos-prego (*Cebus*) foram capturados em gaiolas apropriadas de acordo com a autorização junto ao IBAMA (processo nº 02027002691/2005) e transportados aos laboratórios dos respectivos locais de coleta, onde permaneceram até a coleta das amostras. Os animais foram anestesiados com diazepam (1mg/kg) e ketamina (10mg/kg) nas doses 1 mg e 10 mg, respectivamente via intramuscular, uma vez, na coxa. As amostras foram coletadas, e posteriormente, passado o efeito do anestésico os animais foram soltos.

3.2 Cepas de referência

Acholeplasma laidlawii PG-38, *Mycoplasma arginini* G-230, *Mycoplasma orale* CH-19299, T-960, *Mycoplasma hominis* PG-21, *Mycoplasma fermentans* PG18, *Mycoplasma genitalium* G37, *Mycoplasma hominis* PG21, *Mycoplasma lipophilum* 27104, *Mycoplasma orale* CH-19299, *Mycoplasma pneumoniae* FH, *Mycoplasma primum* 15497, *Mycoplasma salivarium* PG-20, *Mycoplasma conjunctivae* HRC581 *Ureaplasma urealyticum* T-960, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 25293,

Streptococcus pyogenes ATCC 12345, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Salmonella typhimurium* ATCC C5 CIP, *Bacteroides fragilis* C45A AUS 00306, *Candida albicans* ATCC 90028. As cepas foram obtidas da coleção do Laboratório de Micoplasma do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

Tabela 1: Localização, espécies, hábitat, contato entre eles, sexo e quantidade de amostras clínicas analisadas dos animais estudados.

Locais	Espécies	hábitat	Contato entre eles	Quantidade/sexo
Parque Estadual do Tietê São Paulo/SP	<i>Cebus apella</i>	Vida livre	sim	05 – fêmeas 06 - machos
Rivieira – São Paulo	<i>Cebus apella</i> <i>nigritus</i>	Vida livre	sim	06 – fêmeas 16 – machos 01 - indeterminado
CETAS – Manaus/AM	<i>Cebus apella</i> <i>Cebus albifrons</i>	Vida livre	não	03 – machos 01 – fêmea 01 – macho 01 - fêmea
UNESP – Araçatuba/SP	<i>Cebus apella</i>	Cativeiro e vida livre	sim	05 – machos 13 – fêmeas
Total				58

3.3 Meios de Cultivo

3.3.1 Meio líquido/sólido SP4 (TULLY, 1995)

- Triptona	10,0 g
- Peptona.....	5,3 g
- Mycoplasma Broth Base.....	3,5 g
- Água destilada.....	750 mL

O pH foi ajustado em 7,8.

Adição de 10 gramas (Gr.) de Agar Noble purificado para preparar meio sólido;

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

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

Soro eqüino.....	180 mL
CRML 1066.....	50 mL
Extrato fresco de levedura 25%	35 mL
Glicose 10 %.....	10 mL
Arginina 10 %.....	1 mL
Yeastolate.	10 mL
Vermelho de Fenol 0,5%.....	4 mL
Penicilina 100.000U/ mL	1 mL
Acetato de tálio.....	10 mL

Realização do teste de esterilidade a 37°C por 24 horas.

3.3.2 Meios Líquido U_B (RUHNKE e ROSENDAL, 1994)

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

O pH foi ajustado em 6,0.

Autoclavar a 121°C por 20 min;

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

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

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

3.3.3 Meios Sólido U_B (RUHNKE e ROSENDAL, 1994)

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

O pH foi ajustado em 5,5.

Autoclavar a 121°C por 20 min.;

Acrescentar assepticamente ao meio autoclavado:

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

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

3.4 Coleta de amostra clínica

Para cada animal foram coletadas cinco amostras clínicas (“swabs”): uma da conjuntiva (armazenada e transportada a 4°C em meio SP4), duas da orofaringe (cada “swab” foi armazenado e transportado a 4°C em meio SP4 e meio UB) e duas amostras do trato urogenital (prepúcio) que foi armazenado e transportado como os “swabs” da orofaringe. Desta foram obtidas amostras de três sítios anatômicos.

3.5 Semeadura e Identificação

Os meios líquidos SP4 e U_B utilizados como transporte, contendo o “swab”, foram homogeneizados, filtrados em membranas com porosidade de 0,45 µm e submetidos a três diluições decimais (até 10⁻³). Resultando em 15 tubos para cada animal totalizando 870 tubos. Na semeadura em ágar SP4 e U_B foi utilizado o “swab” e 50 µL da diluição 10⁻³. Resultando em 10 placas para cada animal totalizando 580 placas. Os meios líquidos e sólidos foram incubados a 37 °C, sendo as placas com ágar SP4 incubadas em condições de microaerofilia e observadas por 30 dias consecutivos.

Os micoplasmas foram caracterizados pela alteração do pH do caldo devido a utilização da glicose e/ou arginina. A caracterização dos micoplasmas em meio sólido foi realizada por meio da produção de colônias em forma de “ovo frito” e formação de filmes e manchas (RAZIN e TULLY, 1983).

Os ureaplasmas foram caracterizados pela visualização do aumento do pH no meio líquido e sólido devido à utilização da uréia. No meio sólido e pela presença de pequenas colônias granulosas e de coloração marrom escuro devido à precipitação

de cátions de manganês pela atividade da urease (RUHNKE, 1994).

3.5.1 Subcultivo das amostras de referência para *Mollicutes*

As amostras de referência de micoplasmas, estocadas em meio SP4 a -20 °C foram subcultivadas em meio líquido SP4, e as amostras de ureaplasma subcultivadas em meio UB.

3.6 Extração do DNA das amostras clínicas

As amostras clínicas foram submetidas ao método de extração por fervura, baseando-se pela metodologia descrita por FAN *et al.* (1995). Uma alíquota de 1mL de cada amostra coletada foi centrifugada a 13813 *g* por 10 minutos (min.), em centrífuga refrigerada e o sedimento foi lavado com 100 µl de tampão PBS (2,6 mM NaH₂PO₄; 7,4 mM NaHPO₄; 14mM NaCl; pH 7,2) seguida de centrifugação. Este procedimento foi repetido duas vezes. O sedimento foi ressuspendido em 25 µl de PBS e homogeneizado. A seguir, a suspensão foi aquecida a 100 °C por 10 min. em “banho-maria” e posteriormente resfriada em gelo por 5 min. e submetido a centrifugação (15133 *g* por 10 min). O sobrenadante contendo o DNA foi estocado a -20 °C.

3.7 Oligonucleotídios iniciadores (“primers”) para a detecção de *M. primatum* e *M. lipophilum*

Foi utilizado o gene 16S do rRNA de *M. primatum* (Figura 1) e *M. lipophilum* (Figura 2). A sequência do fragmento-alvo foi obtida do GenBank (JOHANSSON e

PETTERSSON, 2001) pelo número de acesso [AF221118](#) e [AB069815](#), respectivamente. As seqüências foram analisadas utilizando-se o programa Megalign – Dnastar Inc. para verificação de regiões-alvo com diferenças genéticas entre as espécies de micoplasma. Foram determinadas as regiões que apresentavam maior polimorfismo entre as espécies. Diversos “primers” complementares a esta região, obtidos pelo programa PrimerSelect – Dnastar Inc. foram analisados e selecionados para a escolha e posterior síntese. A seqüência do par de “primers” escolhido está apresentada no Quadro 1 e Quadro 2.

Quadro 1 – “Primers” específicos para detecção de *M. primum*, seqüência, tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
PR1	5'- AGCTAACTGGGCCATACAC-3'	416
PR2	5'- GCAGTCTCCTTAGAGTG-3'	

Quadro 2 – “Primers” específicos para detecção de *M. lipophilum* seqüência, tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
LI1	5'- CCTTTACAACCCGAAGGT-3'	232
LI2	5'- GGAGCTTCAAAGCTTCGC -3'	

3.7.1 Padronização da PCR *M. primum* e *M. lipophilum*

No desenvolvimento da PCR foram analisadas, em reações independentes, diferentes temperaturas de hibridização (50 a 60 °C) e concentrações de MgCl₂ (1,0 a 2,5 mM). Os parâmetros foram analisados utilizando-se concentrações constantes de uma unidade (1U)Taq polimerase, tampão, deoxirribonucleotídeos (dNTPs) 1 µl DNA-alvo e número de ciclos 1 ciclo de 4 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min. 65 °C e 1 min. a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 5 min a 72 °C.

3.7.2 Teste de especificidade e sensibilidade da PCR

O teste de sensibilidade foi realizado por meio de DNA extraído de 20mL de cultura de *M. primum* 15497 e *M. lipophilum* 27104. O DNA foi obtido pelo método de fervura e quantificado em espectrofotômetro Beckman DU_600, utilizando o comprimento de onda (absorbância) de 260 nm. A seguir, foram realizadas diluições decimais do DNA extraído em água ultrapura estéril, partindo de 1µg até 1 atto DNA/µl. Entre cada diluição, as amostras foram fervidas durante 1 minuto e homogeneizadas, evitando-se a formação de grumos de DNA (SAMBROOK et al., 1989).

Para avaliar a especificidade da metodologia foram realizadas amplificações de DNA de micoplasma de origem humana e suína, bem como das cepas bacterianas com parede celular. Para cada amplificação foi utilizado um controle positivo com *M. primum* 15497 e *M. lipophilum* 27104, e um controle negativo com água ultrapura estéril.

3.7.3 Parâmetros definidos na PCR

A reação *in vitro* para a detecção de *M. primatum* foi padronizada em volumes 25 µl contendo: 2,5µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2,5 µL de MgCl₂ (50mM), 0,4 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1,0 µl de DNA cromossomal teste e 0,1 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada em termociclador programado para 1 ciclo de 4 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min. 65 °C e 1 min. a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

```
1 ctggctgtgt gcctaataca tgcattgtga gcgaaggtag caatacotta ggggcgaatg
61 ggtgagtaac acgtactcaa cgtacctttt agattggaat agcgggtgga aacatccgat
121 aatgccgaat acttattaag atcgcatggt tttaataata aaagaagcgt ttgcttcgct
181 gaaagatcgg agtgcgcaac attagcttgt tgggtgagga acggcccacc aaggcgatga
241 tgttttagcgg ggttgagaga ctgaaccgcc acactgggac tgagatacgg ccagactcc
301 tacgggaggg agcagtaggg aatattccac aatggacgaa agtcgtatgg agcgacacag
361 cgtgcaggat gaaggcccta tgggttgtaa actgctgtgg ttaggggaaga aaaagtaata
421 taggaaatga tattaccttg acggtacctg attagaaagc aacggctaac tatgtgccag
481 cagccgcggg aatacatagg ttgcaagcgt tatccgaaat tattgggcgt aaagcgtctg
541 taggttggtt gttaagtctg gcggttaaatt ttggggctca accccaaaac gcgttggtata
601 ctggcaaaact ggagttatgt agaggttatg ggaattcctt gtgaagcggg gaaatgcgta
661 gatataagga agaacatcaa tatggcggaag gcagctaact gggcatacac tgacactgag
721 agacgaaagc gtggggagca aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cctaaacgat
781 gatcattagt tgatggggaa ctcatcgacg cagctaacgc attaaatgat ccgcctgagt
841 agtacgttcg caagaataaa acttaaagga attgacgggg atccgcacaa gcggtggagc
901 atgtggttta atttgaagat acgogtagaa ccttaccac tcttgacatc ttctgcaaag
961 ctatggagac atagtggagg ttaacagaat gacagatggt gcatgggtgt cgtcagctcg
1021 tgtcgtgaga tgttcgggta agtcctgcaa cgagcgcaac ccttgctcct agttactaac
1081 atttagttga gcaacttaag gagactgccc gagtaatcgg gaggaagggt gggacgacgt
1141 caaatcatca tgccctctac gagtggggct acacacgtgc tacaatggac ggtacaaaga
1201 gaagcgaaat ggtgacatgg agcaaacctc aaaaaaccgt tctcagttcg gattgaagtc
1261 tgcaactcga cttcatgaag tcggaatcgc tagtaatcgt agatcagcta cgctacgggtg
1321 aatacgttct cgggtcttgt acacaccgcc cgtcaaacca tgggagctgg taatgccoga
1381 agtcggttta taaagaaact gcctaaggca ggactggtga ctgggggttaa gtcgtaacaa
1441 ggtatcccta cgagaacgtg cg
```

Figura 1. Sequência completa do gene 16S rRNA de *Mycoplasma primatum*. As seqüências em destacadas correspondem aos “primers” PR1 e PR2.

```

1  attttggggc tcaaccccaa ctogcgttgg atactggcaa gctagagtta tgtagaggtt
61  agcgggaatto catgtgaagc ggtgaaatgc gtagatatat ggaagaacac caagatggcg
121 aaggcagcta actggacata cactgacact gagagacgaa agcatgggga gcaaacagga
181 ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac gatgatcatt agttgatggg agactcatcg
241 acgcagct

```

Figura 2. Seqüência completa do gene 16S rRNA de *Mycoplasma lipophilum*. As seqüências em destacadas correspondem aos “primers” L1 e L2.

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

A PCR foi realizada obedecendo-se os cuidados de manutenção do controle de qualidade citadas por Kwok e Higushi (1989) para a validação da metodologia, como a utilização de salas exclusivas para o preparo da PCR (incluindo o armazenamento em área livre de produtos amplificados), das amostras de DNA e da eletroforese, utilizando-se de luvas e suas trocas a cada saída ou entrada da sala (HIRATA, 1997). Para cada reação foram utilizados 1 controle positivo contendo DNA da cepa de referência e 1 controle negativo, sendo o DNA substituído por água ultrapura estéril.

3.8.1 PCR genérica para a Classe dos *Mollicutes*

Os “primers” genéricos-específicos GPO3 e MGSO (Quadro 3) utilizados são complementares a seqüências conservadas do gene 16S do rRNA região V2 e V7, respectivamente) para a Classe dos *Mollicutes* (micoplasma, acholeplasma, ureaplasma e espiroplasma), descrito por Van Kuppeveld et al. (1992).

Quadro 3 – “Primers” para a detecção de microrganismos da Classe dos *Mollicutes*, sequências e tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
GPO3	5'- GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	270
MGSO	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'	

A reação foi preparada em volumes de 25µl contendo: 2,5µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 1 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1µL de MgCl₂ (50mM), 0,4 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1,0 µl de DNA cromossomal teste e 0,1 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação dos “primers” genéricos foi estabelecida de acordo com Van Kuppeveld et al. (1992) em 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a 55 °C e 30s a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 10 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4°C até o momento da eletroforese.

3.8.2 PCR para detecção de microrganismos pertencentes ao gênero *Ureaplasma*

Os “primers” s UGPF e UGPR (Quadro 4) utilizados para a detecção de microrganismos pertencentes ao gênero *Ureaplasma* são complementares a seqüência conservada do gene 16S do rRNA (LAUERMAN, 1998).

A reação foi preparada em volumes de 25µl contendo: 2,5µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1µL de MgCl₂

(50mM), 0,2 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1,0 µl de DNA cromossomal teste e 0,1 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador programado para: 40 ciclos a 94 °C durante 30s, 55 °C durante 30s, 72 °C durante 60s. e um ciclo final de 72 °C por cinco min. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

Quadro 4 – “Primers” para a detecção de microrganismos do gênero *Ureaplasma*, sequências e tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
UGPF	5'-GGATGAGGGTGCGACGTATC-3	644
UGPR	'5'-GCGTTAGCTACAACACCGAC -3'	

3.8.3 PCR espécie-específica para detecção de *Ureaplasma urealyticum* (DAXBOECK et al., 2005)

Os “primers” U4 e U5 (Quadro 5) utilizados para a detecção de *U. urealyticum* são complementares a seqüência conservada do gene 16S do rRNA (DAXBOECK et al., 2005).

Quadro 5 – “Primers” para a detecção de *Ureaplasma urealyticum*, sequências e tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
U4	5'- ACGACGTCCATAAGCAACT – 3'	429
U5	5' – CAATCTGCTCGTGAAGTATTAC – 3'	

A reação foi preparada em volumes de 25µl contendo: 2,5µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1 µl de DNA cromossomal teste e 0,25 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador programado para 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 35 ciclos de 30s a 95 °C, 1 min. a 61 °C e 1 min. a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

3.8.4 PCR espécie-específica para detecção de *Mycoplasma arginini* e *M. salivarium*.

Os “primers” MAGF e GP4R, MSALF E MSALR (Quadro 6) utilizados para a detecção de *M. arginini* e *M. salivarium*, respectivamente, são complementares a seqüência conservada do gene 16S do rRNA (LAUERMAN, 1995).

Quadro 6 – “Primers” para a detecção de *M. arginini* e *M. salivarium*, sequências e tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
MAGF	5' – GCATGGAATCGCATGATTCCT - 3'	545
GP4R	5' - GGTGTTCTTCCTTATATCTACGC - 3'	
MSALF	5' - ATGGATTGTAAAGTGCTGTTGCTAG - 3'	434
GP4R	5' - GCGTCAACAGTTCTCTGCCG - 3'	

A reação foi preparada em volumes de 25µl contendo: 2,5µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,7 µL de MgCl₂ (50mM), 0,25 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1 µl de DNA cromossomal teste e 0,1 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador programado para 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a 55 °C e 1 min. a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

3.8.5 PCR espécie-específica para detecção de *Acholeaplasma laidlawii*, *Mycoplasma fermentans* e *M. orale*.

Os “primers” UNI- e FER+, UNI- e ORA5, UNI- E ACHO3 (Quadro 7) utilizados para a detecção de *M. fermentans*, *M. orale* e *A. laidlawii*, respectivamente, são

complementares a seqüência conservada do gene 16S do rRNA (DUSSERGET et al., 1994).

A reação foi preparada em volumes de 25 µl contendo: 2,5 µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,6 µL de MgCl₂ (50mM), 0,4 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1 µl de DNA cromossomal teste e 0,1 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador programado para 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 30 ciclos de 30s a 95 °C, 90s a 64 °C e 90s a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 10 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

Quadro 7 – “Primers” para a detecção de *M. fermentans*, *M. orale* e *A. laidlawii*, seqüências e tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
UNI-	5' TAATCCTGTTTGCTCCCCAC 3'	579
FER+	5' AAGAAGCGTTTCTTCGCTGG 3'	
UNI-	5'TAATCCTGTTTGCTCCCCAC 3'	583
ORA5	5' GGAGCGTTTCGTCCGCTAAG 3'	
UNI-	5' TAATCCTGTTTGCTCCCCAC 3'	505
ACHO3	5' AGCCGGACTGAGAGGTCTAC 3'	

3.8.6 PCR espécie-específica para detecção de *Mycoplasma genitalium* (DAXBOECK et al., 2005)

Os “primers” MGE1 e MGE2 (Quadro 8) utilizados para a detecção de *M. genitalium*, são complementares a sequência conservada do gene 16S do rRNA (DAXBOECK et al., 2005)

Quadro 8 – “Primers” para a detecção de *M. genitalium*, sequências e tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
MGE1	5' CACCGAAAAAATTAATGGG 3'	594
MGE2	5' AAGAATGTTTTTGAACAGTTCTTT3'	

A reação foi preparada em volumes de 25 µl contendo: 2,5 µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2,5 µL de MgCl₂ (50mM), 0,4 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1 µl de DNA cromossomal teste e 0,1 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador programado para 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 35 ciclos de 1 min. a 95 °C, 1 min. a 65 °C e 1 min. a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 10 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

3.8.7 PCR espécie-específica para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*

Os “primers” MPH1 e MPH2 (Quadro 9) utilizados para a detecção de *M. pneumoniae*, são complementares a seqüência conservada do gene 16S do rRNA (IEVEN et al., 1997).

Quadro 9 – “Primers” para a detecção de *M. pneumoniae*, seqüências e tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
MPH1	5' AAGGACCTGCAAGGGTTCGT 3'	277
MPH2	5' CTCTAGCCATTACCTGCTAA 3'	

A reação foi preparada em volumes de 25 µl contendo: 2,5 µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,25 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1 µl de DNA cromossomal teste e 0,1 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador programado para 1 ciclo de 4 min a 95 °C, 40 ciclos de 1 min. a 95 °C, 1 min. a 60 °C e 90 s a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 4 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

3.8.8 PCR espécie-específica para detecção de *Mycoplasma hominis*.

Os “primers” M1 e M2 (Quadro 10) utilizados para a detecção de *M. hominis*, são complementares a seqüência conservada do gene 16S do rRNA (DAXBOECK et al., 2005).

Quadro 10 – “Primers” para a detecção de *M. hominis* seqüências e tamanho do produto amplificado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
M1	5' CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C- 3'	334
M2	5' GGT ACC GTC AGT CTG CAA T-3'	

A reação foi preparada em volumes de 25 µl contendo: 2,5 µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 0,75 µL de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 5 µl de DNA cromossomal teste e 0,25 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador programado para 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 35 ciclos de 30s a 95 °C, 1 min. a 61 °C e 1 min a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

3.8.9 PCR espécie-específica para detecção de *Mycoplasma conjunctivae*

Os “primers” MCJR e MCJF (Quadro 11) utilizados para a detecção de *M. conjunctivae*, são complementares a sequência conservada do gene 16S do rRNA (LAUERMAN, 1998) .

Quadro 11 – “Primers” para a detecção de *M. conjunctivae*, sequências e tamanho do produto amplificado esperado.

Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
MCJR	5' CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C- 3'	330
MCJF	5' GGT ACC GTC AGT CTG CAA T-3'	

A reação foi preparada em volumes de 25 µl contendo: 2,5 µL de tampão para a PCR (KCl 500mM, Tris 200Mm em pH 8,4); 2 µL de solução de deoxiribonucleotídeos contendo 100mM de cada base, ou seja dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 1 µL de MgCl₂ (50mM), 0,25 µl de cada “primer” (50 pmol de concentração), 1 µl de DNA cromossomal teste e 0,25 µl (1 unidade) de Ampli Taq DNA Polimerase (Gibco & Life Technologies do Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador programado para 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 30s a 94 °C, 1 min. a 55 °C e 1 min a 72 °C e logo após, 1 ciclo de 5 min a 72 °C. Após a amplificação, as amostras foram mantidas a 4 °C até o momento da eletroforese.

3.9 Detecção do Produto Amplificado

Os produtos da PCR (10 μ L) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contendo 10 μ g/mL de brometo de etídio em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 2 mM EDTA, pH 8,0). A visualização e fotodocumentação dos produtos foram realizadas sob luz ultravioleta, no aparelho Vilber Lourmat. O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen). Este procedimento foi empregado em todas as análises dos produtos da PCR.

3.10 Análise estatística

As amostras positivas para a PCR da Classe *Mollicutes* foram submetidas ao teste de qui-quadrado para verificar a significância entre as variáveis: amostra (conjuntiva, orofaringe ou urogenital) e o local de coleta, amostra (conjuntiva, orofaringe ou urogenital) e a espécie, amostra (conjuntiva, orofaringe ou urogenital) e o sexo, amostra (conjuntiva, orofaringe ou urogenital) e a idade. As amostras que foram observadas significância ($p < 0,05$) foram aplicadas o teste de YATES para confirmar este resultado.

4 RESULTADOS

4.1 Cultivo das amostras do trato orofaríngeo, urogenital e conjuntiva dos animais para a detecção de micoplasmas.

Das amostras semeadas em meio sólido de material clínico da conjuntiva de *Cebus apella* provenientes do Parque Estadual Tietê obteve-se um isolamento (1,72%). As colônias foram caracterizadas pela forma típicas “ovo frito” e ausência de filmes e manchas (Figura 3). No meio líquido da mesma amostra, houve acidificação do meio indicando presença de espécie fermentadora de glicose. Este isolado foi submetido à técnica de PCR sendo positiva para a Classe *Mollicutes* e negativa para *M. conjunctivae* e *A. laidlawii*. Não foi obtido nenhum isolamento proveniente dos tratos orofaríngeo e urogenital.

Figura 3: Colônias de *Mycoplasma* spp em meio SP4, isoladas de amostra da conjuntiva de macaco sadio. Aumento de 100X.

4.2 Desenvolvimento da técnica de PCR para a detecção de *M. lipophilum* e *M. primatum*

4.2.1 Concentração de $MgCl_2$

As concentrações de $MgCl_2$ testadas em reações independentes na PCR resultaram em produtos de amplificação satisfatórios. Dessa maneira, foi utilizado mesmo protocolo na metodologia da PCR para a detecção de *M. primatum* e *M. lipophilum*. A concentração de 2,5 μl de $MgCl_2$ (2,0mM) permitiu a obtenção de um produto de aproximadamente 416 pb para *M. primatum* e 232 pb para *M. lipophilum* sem ocorrência de inespecificidade na reação.

4.2.2 Temperatura de anelamento

A temperatura de anelamento utilizada foi indicada pelo programa PrimerSelect Dnastar Inc., que analisou o par de “primers”. Não foram obtidos, entretanto, resultados satisfatórios e foi observada a presença de produtos inespecíficos. Após a amplificação com diferentes temperaturas de anelamento, foi possível obter a condição ideal de 65°C para a detecção de *M. primatum* e 64°C para *M. lipophilum* (Figura 4) sem ocorrência de reações inespecíficas.

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando “primers” LI1/LI2, a partir do DNA *M. lipophilum*. Análise da variação da temperatura de anelamento. Colunas 1 a 11: variação de 50 a 60°C em escala de 1 – 1°C; coluna 12: controle negativo das reações com água ultrapura estéril; coluna 13: padrão de peso molecular de DNA – 100 pb.

4.2.3 Teste de especificidade

O teste de especificidade foi realizado somente para *M. primum* e *M. lipophilum*, pois para os outros micoplasmas já havia sido realizado. No teste de especificidade não foram observadas reações positivas para outras espécies de *Mollicutes* e bactérias com parede celular, detectando-se apenas o produto aproximadamente 416 pb esperado para *M. primum* (Figura 5) e 232 pb para *M. lipophilum*.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR com “primers” específicos para *M. primum* PR1/PR2 a partir do DNA extraído de outras espécies de micoplasmas. Coluna 1 a 13: amostras de outras espécies de micoplasma; coluna 14: controle positivo das reações de *M. primum*; coluna 15: controle negativo das reações com água ultrapura estéril; 16: padrão de peso molecular de DNA – 100 pb.

4.2.4 Teste de Sensibilidade

A sensibilidade da PCR com os “primers” para L1/L2 foi testada a partir de diluições decimais do DNA de *M. lipophilum*, a detecção desta espécie de micoplasma até a diluição de 10^{-5} , correspondendo à sensibilidade de aproximadamente 10 pg de DNA/ μ L. A sensibilidade da PCR com os “primers” para PR1/PR2 foi testada a partir de diluições decimais do DNA de *M. primum*, a detecção desta espécie de micoplasma até a diluição de 10^{-4} , correspondendo à sensibilidade de aproximadamente 1 pg de DNA/ μ L.

4.3 Detecção de *Mollicutes* em amostras da orofaringe, de macacos por meio da PCR utilizando “primers” genéricos e espécie-específicos

Na PCR com DNA extraído a partir das amostras coletadas em meio SP4 que foram submetidos à PCR com “primers” genéricos para a Classe *Mollicutes* (Tabela 2) observou-se reação positiva em 32 amostras (55,17%). Os resultados das PCRs espécie-específicos (Figuras 06 e 07) estão apresentados na Tabela 3. O DNA extraído das amostras clínicas coletadas em meio UB foi submetido a PCR com “primers” genéricos para o gênero *Ureaplasma* resultando em reações positivas em 25 amostras (43,10%) (Tabela 2) e negativas a PCR *U. urealyticum*.

Tabela 2. Número de reações positivas na PCR genérica para a detecção de microrganismos da Classe *Mollicutes* (meio SP4) e Gênero *Ureaplasma* (meio UB) a partir de DNA extraído de amostras de “swab” orofaríngeo de macacos.

Procedência	Nº de animais	PCR Classe	PCR Gênero
		<i>Mollicutes</i> (%)	<i>Ureaplasma</i> (%)
1	11	10 (90,9)	10 (90,9)
2	23	18 (78,2)	15 (65,3)
3	6	01 (16,6)	0
4	18	03 (5,17)	0
TOTAL	58	32 (55,17)	25 (43,10)

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR com “primers” específicos para *M. orale* UNI/ORA5 a partir do DNA extraído de amostras de “swab” orofaríngeo. Coluna 1 a 13: amostras “swab” orofaríngeo; coluna 14: controle positivo das reações de *M. orale*; 15: coluna:padrão de peso molecular de DNA – 100 pb; 16: controle negativo das reações com água ultrapura estéril

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR com “primers” específicos para *M. arginini* MAGF/GP4R a partir do DNA extraído de amostras de “swab” orofaríngeo. Coluna 1 a 13: amostras “swab” orofaríngeo; coluna 14: controle positivo das reações de *M. arginini*; coluna 15: controle negativo das reações com água ultrapura estéril; coluna 16: padrão de peso molecular de DNA – 100 pb.

Tabela 3. Número de reações positivas na PCR espécie-específica a partir de DNA extraído de amostras de “swab” orofaríngeo de macacos.

Procedência	Nº de animais	PCR espécie-específico (%)								
		<i>M. salivarium</i>	<i>M. arginini</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>A. laidlawii</i>	<i>M. primum</i>	<i>M. lipophilum</i>	<i>U. urealyticum</i>
1	11	8 (72,7)	7 (63,6)	5 (45,4)	0	0	0	0	0	0
2	23	15 (65,2)	11 (47,8)	5 (21,7)	0	0	0	0	0	0
3	06	1 (16,6)	0	1 (16,6)	0	0	0	0	0	0
4	18	0	7 (12,06)	0	0	0	0	0	0	0
Total	58	24 (41,37)	25 (43,10)	11(18,96)	0	0	0	0	0	0

4.4 Detecção de micoplasmas em amostras do trato urogenital de macacos por meio da PCR utilizando “primers” genéricos e espécie-específicos.

Na PCR com “primers” genérico para a Classe *Mollicutes*, 16 amostras (27,58%) foram positivas (Tabela 4). Os resultados das amostras submetidas à PCR utilizando “primers” específicos estão apresentados na Tabela 5. Na PCR com “primers” genéricos para o gênero *Ureaplasma* 19 amostras (Figura 9) (32,75%) foram positivas e na espécie-específica para *U. urealyticum* reação foram negativas.

Tabela 4. Número de reações positivas na PCR genérica para a detecção de microrganismos da Classe *Mollicutes* e Gênero *Ureaplasma* a partir de DNA extraído de amostras de “swab” urogenital de macacos.

Locais	Nº de animais	PCR Classe	PCR Gênero
		<i>Mollicutes</i> (%)	<i>Ureaplasma</i>
1	11	05 (45,4)	09 (81,8)
2	23	09 (39,1)	08 (34,7)
3	6	01 (16,6)	02 (33,3)
4	18	01 (5,55)	0
TOTAL	58	16 (27,58)	19 (32,75)

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR com “primers” para o gênero *Ureaplasma* U4/U5 a partir do DNA extraído de amostras de “swab” urogenital. Coluna 1 a 9: amostras “swab” urogenital; coluna 10: controle positivo das reações de *Ureaplasma*; coluna 11: controle negativo das reações com água ultrapura estéril; 12: padrão de peso molecular de DNA – 100 pb.

Tabela 5. Número de reações positivas na PCR espécie-específica a partir de DNA extraído de amostras de “swab” urogenital de macacos.

Procedência	Nº de animais	PCR espécie-específico (%)							
		<i>M. arginini</i>	<i>A. laidlawi</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>U.urealyticum</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>M.lipophilum</i>	<i>M. primum</i>
1	11	0	1 (9)	0	0	0	0	0	0
2	23	05 (21,7)	0	0	0	0	0	0	0
3	06	0	0	0	0	0	0	0	0
4	18	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	58	05 (8,62)	1 (1,72)	0	0	0	0	0	0

4.5 Detecção de micoplasmas em amostras de “swab” coletados da conjuntiva de macacos por meio da PCR utilizando “primers” genéricos e “primers” espécie-específicos

Na PCR com “primers” genéricos observou reação positiva em 17 amostras (29,31%). Os resultados das amostras submetidas à PCR utilizando “primers” específicos podem ser analisados na Tabela 6.

Tabela 6. Número de reações positivas para micoplasmas na PCR genérica para a Classe *Mollicutes* e espécie-específica a partir de DNA extraídos de amostras de “swab” da conjuntiva de macacos.

Procedência	Nº de animais	PCR		
		Classe Mollicutes (%)	<i>A. laidlawii</i> (%)	<i>M. conjunctivae</i>
1	11	03 (27,2)	1 (9)	0
2	23	08 (34,7)	0	0
3	6	03 (50,0)	0	0
4	18	03 (5,17)	0	0
TOTAL	58	17 (29,31)	1 (1,72)	0

4.6 Análise Estatística

Foi realizado o teste de qui-quadrado para verificar a significância ($p < 0,05$), posteriormente foi aplicado o teste de YATES para confirmar sua confirmação. Foi observado significância nas seguintes correlações: presença de micoplasma na orofaringe em relação à espécie; presença de micoplasma na orofaringe em relação ao local; presença de ureaplasma na orofaringe em relação ao local; presença de

micoplasma na urogenital em relação ao local; presença de ureaplasma na orofaringe em relação ao local. Em todas as outras variáveis não foram encontradas significância.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi padronizada a metodologia da PCR para a detecção de *M. primatum* e *M. lipophilum*, utilizando-se “primers” complementares ao gene 16S do rRNA. Diversas técnicas de PCR para detecção de *Mollicutes* são baseadas neste gene (VAN KUPPEVELD et al., 1992; GONZÁLEZ et al., 1995; CARDOSO et al., 2000; EASTICK et al., 2003).

O gene 16S rRNA é amplamente utilizado na detecção de *Mollicutes* por apresentar seqüência altamente conservadas da mesma espécie e com grande variabilidade genética entre espécies e gênero, favorecendo a seleção de “primers” específicos para a PCR (VAN KUPPEVELD et al., 1992).

Blanchard et al. (1991) verificaram a necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnósticos sensíveis e rápidos na detecção de *Mollicutes*, devido às dificuldades encontradas no isolamento. Houve minimização significativa no tempo para a detecção destes microrganismos com a utilização da PCR. Posteriormente, esta técnica foi considerada essencial no diagnóstico laboratorial (KEMPF, 1998; DAXBOECK et al., 2003). Entretanto, o cultivo é importante no estudo do microrganismo para elucidação da sua epidemiologia. Objetivando um diagnóstico rápido na clínica a PCR é mais vantajosa que o cultivo sendo cada vez mais utilizadas no diagnóstico de micoplasmas (METTIFOGO, 2003; STELLRECHT et al., 2004; MARQUES et al., 2007).

A determinação da concentração de $MgCl_2$ e temperatura utilizadas neste estudo mostraram-se específicas para *M. lipophilum* e *M. primatum*. A hibridização dos “primers” específicos, a incorporação de nucleotídeos e a atividade da enzima Taq polimerase são influenciada pela concentração dos reagentes e temperatura,

ocasionando falta de especificidade e comprometimento dos resultados (MARQUES, 2005).

As técnicas moleculares, como a PCR, pode ser uma alternativa pertinente no diagnóstico destes microrganismos. Entretanto, a vantagem do aumento na sensibilidade da metodologia no diagnóstico molecular dos *Mollicutes* (devido à amplificação do DNA), pode comprometer os resultados devido a contaminação de DNA de outros microrganismos (URSI et al., 2003). Neste estudo foram utilizados procedimentos adequados para evitar a contaminação bem como a comprovação da ausência desta possibilidade utilizando-se de controle negativo em todas as reações da PCR.

Os relatos de micoplasmoses em macacos são escassos. A maioria dos estudos se restringe a utilização desses animais como modelos experimentais de infecções por micoplasmas que acometem os humanos. A eficiência de modelos experimentais empregados, nos estudos das micoplasmoses humanas, está relacionada diretamente com as espécies de micoplasma e macacos. (KRYLOVA et al., 2002).

Algumas doenças emergentes, em animais silvestres, podem ter a mesma classificação na população humana, representando uma íntima associação entre elas, como consequência do compartilhamento do mesmo patógeno devido algumas mudanças ambientais. Tais mudanças, ocasionadas pelo homem, podem ser responsáveis pelas principais causas das doenças infecciosas emergentes em humanos, animais domésticos e silvestres (DASZAK et al., 2001).

O aumento do potencial de transmissão das doenças entre homem e macaco é uma das investigações que devem ser aprimoradas no que se refere ao contato

humano com animais silvestres, especialmente, em locais nos quais não há informações sobre a presença ou a prevalência de microrganismos com potencial patogênico aos humanos (MUEHLENBEIN, 2005).

Os estudos dos fatores que influenciam a evolução das doenças infecciosas em animais silvestres tornam-se necessários, visando à compreensão e a importância na conservação desses animais. Algumas atividades humanas aumentam os riscos na ocorrência de doenças emergentes (DASZAK et al., 2000).

No Brasil há poucos estudos sobre a presença de micoplasmas em animais silvestres. A presença do micoplasma pode estar envolvida ou associada a quadros patológicos. Estudos em outros países relatam o isolamento em primatas de diversas espécies de microrganismos pertencentes à classe *Mollicutes* e os correlacionam com diferentes doenças. Considerando a ausência de estudos de mollicutes em macacos no Brasil o presente estudo descreveu a detecção destas bactérias nestes animais.

Foi obtido um isolamentos de “swabs” coletados de conjuntiva de macacos. Na literatura não há relatos de isolamento de micoplasmas de primatas não-humanos de vida livre. Os cultivos das amostras coletadas de macacos foram observados por um período de 30 dias e o isolamento foi obtido no 22º dia. A literatura sugere um período de observação, para o cultivo e isolamento de micoplasmas, por 14 dias aproximadamente, e após este período a amostra é considerada negativa pelo cultivo e posteriormente submetida à PCR (BUZINHANI, 2001). Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os micoplasmas de macacos necessitam de um tempo maior de incubação para a tentativa de isolamento. As amostras foram submetidas à PCR com “primer”

espécie-específico para *Mycoplasma conjunctivae* e *Acholeplasma laidlawii* e não obtivemos resultados positivos. Há necessidade de realização do seqüenciamento desse isolado para verificação de uma possível espécie ainda não relatada.

Os materiais coletados neste estudo possuíam outros microrganismos da microbiota. A filtração das amostras coletadas em com 0,45 µm de porosidade.

No presente estudo, verificou-se que 55,71% das amostras clínicas da orofaringe foram positivas pela PCR na detecção de microrganismos da Classe *Mollicutes*. Estes resultados estão de acordo com os achados em primatas não humanos de laboratório mantidos em cativeiro (PAESSLER, 2002). Entretanto, em nosso estudo a detecção foram de vida livre.

Foram obtidas 11 amostras (18,96%) positivas de “swab” orofaríngeo submetidas à PCR utilizando “primer” espécie-específico para *M. pneumoniae*. Estudos realizados por Barile et al. (1990) relataram que esta espécie de micoplasma é patogênica para o homem causando, pneumonia atípica, e potencialmente patogênica para os macacos resultando na mesma enfermidade. Estudos realizados com infecções experimentais por *M. pneumoniae* em chimpanzés apresentaram sinais clínicos similares aos que ocorrem em humanos. Stipkovits e et al. (1989) isolaram *M. pneumoniae* da traquéia, brônquios e pulmão em 13 macacos que vieram a óbito por pneumonia severa.

Neste estudo as amostras de “swab” orofaríngeo submetidas à PCR com “primers” espécie-específicos detectaram a presença de DNA de *M. salivarium* em 41,37% (24 amostras) dos animais estudados. Apesar dos relatos desta espécie em humanos ser antiga ou insuficiente, considera-se que *M. salivarium* faça parte da

microbiota bucal em humanos, porém esses microrganismos associado à infecção gengival em humanos já foram relados (WATANABE et al., 1986).

A presença dos *Mollicutes* na microbiota de humanos é ainda pouco compreendida, pois, o potencial de oportunismo destas bactérias é um desafio na compreensão da relação parasito-hospedeiro. Verificou-se a presença de micoplasmas de origem animal isolados principalmente de humanos imunocomprometidos. Esses indivíduos são mais suscetíveis a infecções de espécies classificadas como comensais em humanos do trato respiratório ou urogenital como *M. salivarium*, *M. orale*, *M. hominis* ou *U. urealyticum* (PAESSLER, 2002). Entretanto a classificação desses mollicutes como comensais é inadequada, pois o termo comensal é utilizado na designação de uma relação interespecífica beneficiando uma das espécies sem causar o prejuízo da outra.

Espécies de mamíferos filogeneticamente próximas podem apresentar as mesmas espécies de micoplasmas, como por exemplo, macacos e humanos que podem compartilhar espécies de micoplasmas idênticas ou similares como *M. orale* ou *M. salivarium*. (MARTINEZ-LOHOZ et al., 1970).

Os resultados da PCR para *M. orale*, *M. fermentans* e *A. laidlawii* neste estudo, foram negativos nos “swabs” orofaríngeo. Não há relatos na literatura da presença destes micoplasmas em macacos. Entretanto, estas espécies foram pesquisadas nos primatas não-humanos, devido à alta ocorrência desses microrganismos em humanos.

Do material clínico do trato urogenital dos macacos estudados 16 (27,58%) amostras foram positivas para a Classe *Mollicutes* e 19 (32,75%) para o gênero *Ureaplasma*. Na PCR com “primers” espécie-específico para *U. urealyticum*, *M.*

hominis, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. lipophilum* e *M. primatum*, *M. arginini* e *A. laidlawii* foram obtidos cinco resultados positivos para *M. argini* e um para *A. laidlawii*. Na literatura não há relatos da presença dessas espécies em macacos. Mollere et al. (1978) inocularam experimentalmente *M. hominis* na tuba uterina de fêmeas de *Cercopithecus aethiops*, resultando nesses animais o desenvolvimento de salpingite aguda e parametritis, demonstrando que *M. hominis* pode ser capaz de causar salpingites semelhantes as que ocorrem em humanos. Espécies do trato urogenital de humanos como *M. hominis* e *U. urealyticum* foram inoculadas em uretra de macacos causando uretrite (STIPKOVITS et al., 1990).

Krylova et al. (2001) utilizaram macacos em infecções experimentais, devido à sensibilidade destes animais nas infecções causadas por *M. pneumoniae*, *M. hominis* e *U. urealyticum* (isolados de humanos). As infecções resultaram em sinais clínicos similares às observadas em humanos, sugerindo que este modelo animal apresenta grandes perspectivas nos estudos de patogenicidade para os micoplasma humanos.

A detecção da presença do gênero *Ureaplasma* spp em 19 (32,75%) amostras do trato urogenital e 25 (43,10%) de orofaringe, e a ausência de resultados positivos para *U. urealyticum*, sugere a presença de outra espécie de *Ureaplasma* spp não relatada em macacos. Ogata e Kotani (1981) isolaram ureaplasma da cavidade nasal, orofaríngea e trato urogenital de macacos em cativeiro, sugeriram que os ureaplasmas podem fazer parte da microbiota desses animais tanto no trato respiratório como urogenital.

No Brasil, os macacos silvestres, são pouco utilizados nas pesquisas como modelo experimental. Desse modo, constitui área de grande interesse e

oportunidades para novos estudos (VERONA e PISSINATTI, 2006). A distribuição dos micoplasmas nos animais estudados não era conhecida no país. Os resultados apresentados comprovam a presença de micoplasmas na orofaringe, conjuntiva e trato urogenital nesses animais.

Muitos dos primatas não humanos estão em vias de extinção e ao mesmo tempo sob risco de adquirir doenças dos humanos. O estudo das infecções em primatas não-humanos é de grande importância para a sua preservação, assim como na prevenção de epidemias que apresentam grande impacto na saúde humana (PUJOL, 2006).

Estudos de infecções humanas por micoplasmas de origem animal são raros, mas possivelmente, essas infecções podem ocorrer com frequência inesperada, entretanto, não são relatadas ou estudadas. Na maioria dos casos, o diagnóstico das micoplasmoses é restrito a poucos laboratórios. O desconhecimento dessas infecções e a diversidade dos hospedeiros e diferentes sintomas contribuem na escassez de informações desta enfermidade (PITCHER e NICHOLAS, 2005).

Os relatos de micoplasmas nas infecções em novos hospedeiros não habituais podem ser consequência do potencial de adaptação destes microrganismos a este hospedeiro, provavelmente, resultado da alta taxa de mutação que ocorre nestes microrganismos (PITCHER e NICHOLAS, 2005).

Os mollicutes podem ser transmitidos através das mucosas, pelo contato direto, sexual ou durante o parto. É possível que a transferência intraespecífica possa ocorrer entre homem e animais (ZHANG et al., 1996). Os resultados mostraram a alta frequência de *Ureaplasma* spp, detectados pela PCR nos animais localizados no Parque Estadual do Tietê e Parque do Riviera. Estes resultados

confirmam os de Ogata e Kotani (1981) que sugeriram a presença de ureaplasma na microbiota desses animais podendo se transmitido através do comportamento social destes animais, ou pelo contato sexual. Entretanto, as amostras coletadas dos 18 animais da UNESP foram negativas quando submetidos a PCR para o gênero *Ureaplasma*. Durante a coleta dessas amostras o manipulador relatou dificuldades na contenção e manipulação destes animais para a obtenção dos “swabs” de materiais biológicos dos três sítios anatômicos utilizados neste estudo, o que pode justificar os resultados negativos para a PRC de ureaplasma.

A colaboração interdisciplinar é importante no avanço e compreensão das doenças infecciosas em animais silvestres, especialmente, da sua relação com os ecossistemas pouco estudados (SIMPSON, 2002; DHONDT et al., 2005).

6 CONCLUSÕES

A PCR para detecção de *M. lipophilum* e *M. primateum* mostram-se específica e sensível;

Foi obtido um isolamento da amostra coletada da conjuntiva;

Detectou-se pela primeira vez *M. salivarium*, *M. arginini* e *M. pneumoniae* nas amostras coletadas do trato orofaríngeo *Cebus* por meio da PCR;

Detectou-se pela primeira vez *M. arginini* e *A. laidlawii* nas amostras retiradas do trato urogenital de *Cebus* por meio da PCR;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTOIS, M.; CARON, A.; LEIGHTON, F. A.; BUNN, C. Wildlife and emerging diseases. **Ver. Sci. Tech.**, v. 25, p. 897-912, 2006.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995. 168p.

BARILE, M. F.; GRABOWSKI, M. W. GRAM., C.; SNOY, P.; CHANDLER, D. K. 1999. Experimentally induced *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in non human primate. In: 8^o INTERNATIONAL CONGRESS OF THE ORGANIZATION MYCOPLASMOLOGY, 8., **ION LETTERS**, 1999. Istambul, Turkey. p. 158-159.

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

BENGIS, R. G.; LEIGHTON, F. A.; FISCHER, J. R.; ARTOIS, M.; MORNER, T.; TATE, C. M. The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. **Rev. Sci Tech**, v. 23, p. 497-511, 2004.

BLANCHARD, A.; BEBEAR, C. M. Mycoplasmas of humans. In: RAZIN, R.; HERRMANN, R. (Ed.), **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas**. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 45-71.

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

BLANCHARD, A.; MONTAGNIER, L. GOUGEON, M. L. Influence of microbial infection on the progression of HIV disease. **Trends Microbiol.** , v. 5, p. 326-331, 1997.

BONILLA, H. F.; CHENOWETH, C. E.; TULLY, J. G.; BLYTHE, L. K.; ROBERTSON, J. A.; OGNENOVSKI, V. M.; KAUFFMAN, C. A. *Mycoplasma felis* septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 2, p. 225-225, 1997.

BROWN, D. R.; ZACHER, L. A.; WENDLAND, L. D. BROWN, M.B. Emerging Mycoplasmoses in Wildlife. In: BLANCHARD, A.; BROWNING, G. **Molecular Biology Pathogenicity na Strategies for Control**. Wymontham, Horizon Bioscience. 2005. 383-414.

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

CARDOSO, M. V.; SFORSIN, A. J.; SACARCELLI, E.; TEIXEIRA, S. R.; MIYASHIRO, S.; CAMPOS, F. R. GENOVEZ, M. E. Importância do diagnóstico diferencial em surto de pneumonia enzoótica bovina. **Arq. Inst. Biol.**, v. 69, n. 3, p. 11-113, 2000.

CHANOCK, R. M. Mycoplasma infection of man. **N. Engl. J. Med.**, v. 2, p. 1257-1264, 1965.

CHOMEL, B. B.; BELOTTO, A.; MESLIN, F.X. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 1, p. 6-11, 2007.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A., HYATT, A.D. Emerging infection disease of wildlife – threats to biodiversity and human helth. **Science**, v. 287, p. 443-449, 2000.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious disease in wildlife. **Acta Trop.**, v. 78, p. 103-116, 2001.

DAXBOECK, F.; ZITTA, S.; STADLER, M. , IRO, M.; KRAUSE, R. Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in patients with sterile pyuria. **J. Infect.**, v. 51, p. 54-58, 2005.

DAXBOECK, F.; KRAUSE, R.; WENISCH, C. Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.9, n.4, p. 263-273, 2003.

DEFLER, T.R. **Primates of Colombia**. Bogotá: Conservation International, 2004. 550p.

DEL GUIDICE, R.; CARSHI, T. R.; BARILE, M. F.; LEMCKE, R. M.; TULLY, J. G. Proposal for classifying human strain navel and related simian mycoplasmas as *Mycoplasma primatum* sp. **N. J. Bacteriol.**, v. 108, p. 439-445, 1971.

DEL GUIDICE, R.; CARSHI, T. R.; BARILE, M. F.; YAMASHIROYA, H. M.; VERNA, J. E. Recovery of human mycoplasmas from simian tissues. **Nature, London**, v. 222, p. 1088-1089, 1969.

DHONDT, A. A.; ALTIZER, S.; COOCH, E. G.; DAVIS, A. K.; DAVIS, A.K. Dynamics of a Novel pathogen in an avian host: Mycoplasmal conjunctivitis in house finches. **Acta Trop.**, v. 94, p. 77-93, 2005.

DOBSON, A.; FOUFOPOULOS, J. Emerging infectious pathogens of wildlife. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.**, v.356, p. 1001-1012. 2001.

DUSSERGETT, O.; DUSSOIX, D. R. Rapid, sensitive PCR- based detection of Mycoplasmas in stimulated of animal soro. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.60, p. 953-959. 1994.

DZHIKIDZE, E. K.; KRYLOVA, R.I. Spontaneous Simian Mycoplasma Infection. **Bul. Exp. Biol. Med.**, v.132, p.1195-1200, 2001.

DYBVIG, K.; VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.50, p. 25-57, 1996.

EASTICK, K.; LEEMING, J.P.; CAUL, E. O.; HORNER, P. J.; MILLAR, M. R. A novel polymerase chain to detect *Mycoplasma genitalium*. **Mol. Pathol.**, v. 56, n. 1, p. 25-28, 2003.

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

GALLIA, G. L.; PETROZIELLO, J. M.; BROGAN, J. M.; MCCLESKEY, F.K. DELVECCHIO, V. G. Development of a diagnostic polymerase Chain reaction of *Mycoplasma hominis*. **Mol. Cell. Prob.**, v. 9, p. 475-421. 1995.

GIACOMETTI, M.; JANOSVSKY, M.; JENNY, H.; NICOLET, J.; BELLOY, L.; GOLDSCHIMIDT-CLERMONT, E.; FREY, J. Mycoplasma conjunctivae Infection is not maintained in Alpine Chamois in Eastern Switzerland. **J. Wild. Dis.**, v.38, p. 297-304. 2002.

GOLL, F. Identification of mycoplasmas isolated from domestic animals. In: WHITFORD, H. W.; ROSENBUCH, R. F.; LAUERMAN, L. H. (Ed.). **Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis**. Iowa: Iowa State University Press, 1994. p. 15-26.

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

GRZESKO, J.; ELIAS, M.; MANOWIEC, M.; GABRYS, M.S. Genital mycoplasmas-mobidity and a potential influence on human fertility. **Med Wieku Rozwoj.** v. 10, n.3, p. 985-992, 2006. Pt 2.

GÜBELIN, W.H.; MARTINEZ, A. T.; CÉSPEDES, P.P.; FICH, S. F. FRENZALIDA. C. H. Aplicación de método molecular em la detección de *Mycoplasma genitalium* em hombres y em mujeres embarazadas. **Rev. Chilena Infectolo.**, v. 23, p. 15-19. 2006.

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

HIRATA, M. H. Aplicação do PCR no diagnóstico de doenças infecto-contagiosas. In: HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. **Aplicação da PCR em laboratório clínico e medicina forense**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997. p. 46-67.

IEVEN, M.; URSI, D.; VAN BEVER, H.; QUINT, W.; NIESTERS, H. G.; GOOSSENS, H. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. **J infect Dis.** v. 176, p. 1124-1125, 1997.

JOHANSSON, K. E.; PETTERSSON, B. Taxonomy of Mycoplasmas. **Unpublished**. 2001.

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

KOSHIMIZU, K.; MAGARIBUCHI, T.; YAMAMOTO, K.; OGATA, M. Characterization of Mycoplasmas isolated from imported nonhuman primates. **Jikken Doubutsu**, v.24, n.3, p. 95-101. 1975.

KRYLOVA, R.I.; DZHIKIDZE, K. E.; MARANTIDI, A. N. Experimental Mycoplasma Infection in Monkeys. **Primatology**, v. 133, p. 106-111, 2002.

LAUERMAN, L. H.; CHINA, A. R.; CLOSSER, J. A.; JOHANSEN, D. Avian mycoplasma identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism anlysis. **Avian Dis**, v. 39, p. 804-811, 1995.

LAUERMAN, L.H. *Mycoplasma* PCR Assays. In: **Nucleic Acid Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases**. Alabama, EUA: Dept. of Agriculture and Industries, 1998.

LEENDERTZ, F. H.; PAULI, G.; MAETZ-RENSING, K. et al. Pathogens as divers of population declines: The importance of systematic monitoring in great apes and other threatened mammals. **Biol. Conserv.**, v. 131, p. 325-337, 2006.

LEITH, D. K.; TREVINO, L. B. TULLY, J. G.; SENTERFIT, L. B.; BASEMAN, J. B. Host discrimination of *Mycoplasma pneumoniae* proteinaceous immunogens. **J. Exp. Med.**, v. 157, p. 502-514. 1983.

LEMCKE, R. M.; BURROWS, M. R. Sterol requirements of *Treponema hyodysenteriae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 116, p. 539-543, 1980.

LILY, A. Human social issues, disease, and sympatric apes in the Central African Republic. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v.36, p. 36-40. 2003.

LO, S. C.; DAWSON, M. S.; WONG, D. M.; NEWTON, P. B.; SONODA, M. A.; ENGLER, W. F.; WANG, R. Y.; SHIH, J.W. ALTER, H. J.; WEAR, D. J. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, in situ hybridization and ultrastructural study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.41, p.601-616. 1989.

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

MENARD, C. BROUSSEAU, R. MOUTONS, C. Application of polymerase chain reaction of *Porphyromonas (bacterioides) gingivalis*. **FEEMS Microbiol. Lett.**, v. 15, n. 2, p. 163-168, 1992.

MARQUES, L. M.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; OLIVEIRA, R. C. METTIFOGO, E. TIMENETSKY, J. Detection of *Mycoplasma dispar* by polymerase chain reaction in nasal mucus of calves. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.19, p.103-6. 2007.

MARQUES, L.M. **Diagnóstico de micoplasmas no trato respiratório anterior de bezerros por cultura e reação em cadeia da polimerase** 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MARTINEZ-LOHOZ, A.; KALTER, S.S.; PINKERTON, M.E.; HAYFLICK, L.; Similarities Of *Mycoplasma* Species Isolated From Man And From Nonhuman Primates. **Am. N. Y. Acad. Sci.**, v.174, p. 820-827, 1970.

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

MILES, R. J. Catabolism in *Mollicutes*. **J. Gen. Microbiol**, v. 38, p. 773-1783, 1992.

MILES, R. J.; NICHOLAS, R. A. J. **Methods in molecular biology Mycoplasma protocols.** Totowa, NJ: Humana Press, 1998, p.7-12.

MOLLER , B. R.; FREUNDT, E. A.; BLACK, F.T. FREDERINKSEN, P. Experimental Infection of the Genital Tract of Female Grivet Monkeys by *Mycoplasma hominis*. **Infec. Imm.**, v. 20, p. 248-257, 1978.

MOLLER, B. R.; TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P. M. FREUNDT, E. A. Acute upper genita-tract disease in female monkeys provoked experimentally by *Mycoplasma genitalium*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 417-426, 1985.

MOLLER. B. R; FREUNDT, E. A. Monkey animal model for study of mycoplasmal infections of th urogenital tract. **Sex. Transm. Dis.**, v. 10, p. 359-362. 1983.

MUEHLENBEIN, M. P. Parasitological analyses of the male Chimpanzees (*Pantroglodytes schweinfurthii*) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. **Amer. J. Primat.**, v. 65, p. 167-179, 2005.

NEIMARK, H. C. Origins and evolution of wall-less prokaryotes. In: MADOFF, S. (Ed.). **The bacterial L- forms.** New York: Marcel Dekker, 1986. p. 21-42.

NORCARD, E.; ROUX,E. R. Le microbe de la pleuropneumonia. **Ann. Inst. Pasteur**, v.12, p. 240-262, 1898.

NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 1999, 1936 p.

OGATA, M.; KOTANI, H. Isolation and Serological Characterization of Ureaplasmas from Nonhuman Primates. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 20, p. 935-937, 1981.

PAESSLER, M.; LEVINSON, A.; PATEL, J. B.; SCHUSTER, M.; MINDA, M.; NACHMKIN, I. Disseminated Mycoplasma orale infection in patient with common variable immunodeficiency syndrome. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 44, p. 201-204. 2002.

PITCHER, D.G.; NICHOLAS, R.A.J. Mycoplasma host specicity: Fact or fiction? **Vet. J.**, v. 170, p. 300-3006, 2005.

POLACK, J. D.; WILLIAMS, M. V.; MCELHANEY, R. N. The comparative metabolism of the *Mollicutes* (mycoplasmas): The utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest fre-living cell. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 23, p. 269-235, 1997.

PUJOL, F. H. Virus in nonhuman primate: zoonosis, anthroponosis and biodiversity. **INCI**, v.31, p. 396-402. 2006.

RACANIELLO, V. R. Emerging infectious disease. **J. Clin. Invest.**, v. 113, n. 6, p. 796-798. 2004.

RAZIN, S. Molecular propertus 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. *Mycoplasma* Taxonomy and Ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 3-22.

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

RAZIN, S.; HYMAN, H. C.; WOGUE, D. DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma (Mollicutes)*. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 23, p. 735-741, 1987.

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.

RIVERA-TAPIA, J.; CEDILLO-RAMIREZ, L.; VEJA-BENTTEZ. Mycoplasmas y su importancia médica. **Rev. Biomed.**, v.12, p. 262-271, 2001.

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

SAINSBURY, A. W.; KIRKWOOD, J. K.; BENNETT, P. M. CUNNINGHAM, A. A. Status of wildlife health monitoring in the united kingdom. **Vet. Rec.**, v. 148, n. 18, p. 558-563. 2001.

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

SCHOEB, T. R.; DYBVIG, K.; KEISLING, K. F.; DAVIDSON, M. K.; DAVIS, J. K. Detection of urogenital mycoplasmal infections in primates by use of polymerase chain reaction. **Lab. Anim. Sci.**, v. 47, n. 5, p. 468-471, 1997.

SHIBATA, K. I.; TOTSUKA, M.; WATANABE, T. Phosphatase Activity as a Criterion for Differentiation of Oral Mycoplasmas. **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, p. 970-972. 1986.

SIMECKA, J. W.; DAVIS, J. K.; DAVIDSON, M. K.; ROSS, S. E; OTWELL, P.;CASSEL, G. H. Specific and nonspecific antibody responses in different

segments of the respiratory tract in rats infected with mycoplasma pulmonis. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 10, p. 3715-3721, 1991.

SIMPSON, V. R. Wild animals as reservoirs of infectious diseases in th UK. **Vet. J.** v. 163, p. 128-146, 2002.

SMIRNOVA, T. D.; IAGUZHINSKAIA, O. E.; BALAEVA, E. I. Identification of mycoplasmas isolated from monkeys. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, v. 1, p. 90-94, 1975.

STÄDTLANDER, C. T. K-H.; CASSEL, G. H. *Mycoplasma* Diseases of Animals. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 03-22.

STELLRECHT, K.; WORON, A.; MISHRIK, N.; VENEZIA, R. Comparasion of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas . **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1528-1533, 2004.

STIPKOVITS, L.; MARANTIDI, A. N.; DZIKIDZE, E. K.; KRYOLAVA R. I., CSUTORTOKI, V. Urethral infection of male monkeys by *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. **Zentralbl. Veterinarmed**, v. 37, p. 125-134, 1990.

STIPKOVITS, L.; MARANTIDI, A. N.; DZIKIDZE, E. K.; KRYOLAVA, R. I.; VULVOVICH, J. V. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from monkeys (*Presbitus cristata*). **Zentralbl. Veterinarmed**, v. 36, p. 134-138, 1989.

SUSSMAN, R.W. **Primate ecology and social structure**: New World monkey. Needham Heights: Pearson Custom Publishing, 2000, 207p.

TAYLOR-ROBINSON, D.; FURR, P. M. Update on sexually transmitted mycoplasmas. **Lancet**, v. 351, p. 12-15, 1998. (supp. III).

TRYON, R. A; BASEMAN, R. F. Pathogenicity of Mycoplasmas. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 563-589.

TULLY, J. G. Current status of the mollicute flora of humans. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, p. S2-S9, 1993. (suppl.1).

TULLY, J. G.; TAYLO-ROBINSON, D.; COLE, R. M.; ROSE, D. L. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **Lancet**, v. 1, n. 8233, p. 1288-1291, 1981.

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

URSI, D.; IEVEN, M.; NONRDHOEK, G.T.; RITZLER, M.; ZANDLEVEN, H.; ALTWEGG, .M. An interlaboratory comparison for the detection of *Nycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by the polymerase chain reaction. **J. Microbiol. Methods**, v. 53, p. 289-294, 2003.

UUSKÜLA, A.; KOHL, P. K. Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. **J. STD e AIDS**, v. 13, p. 79-85, 2002.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 2606-2615, 1992.

VERONA, C. E. S.; PISSINATTI, A. Primates: Primatas do novo Mundo (Sagüi, Macaco-prego, Macaco-aranha, Bugio). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. (Ed). **Tratado de animais selvagens**. São Paulo: Roca, 2006.

VILANOVA, R.; SILVA-JUNIOR, J. S.; GRELLE, C. E. V.; MARROIG, G.; CERQUEIRA, R. Limites climáticos e vegetacionais das distribuições de *Cebus*

nigritus e *Cebus robustus* (Cebinae, Platyrrhini). **Neotr. Prim.**, v. 13, n. 1, p. 14-19, 2005.

WATANABE, T.; MATSURA, M. SETO, K. Enumeration, isolation, and species identification of Mycoplasmas in saliva sample from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral Mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*). **J. Clin. Microbiol.**, v. 23, p. 1034-1038, 1986.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WELSH, J.; RAMPINO, N.; McCLELLAND, PERUCHO, M. Nucleic acid fingerprinting by PCR-based methods: applications to problems in aging and mutagenesis. **Mutat. Res.**, v. 338, n. 1, p. 215-229, 1995.

WHITHEAR, K. Diseases due to mycoplasmas. In: WILLIAMS, E. S.; BARKER, I. K. **Infectious diseases of wild mammals**. Iowa: Iowa State Press. 2001, p. 413-421.

WILLIAMS, E. S.; ARTOIS, M.; FISCHER, J.; HAIGH, S. A.; Emerging infectious in wildlife. **Rev. Sci. Tech.**, v. 1, n. 1, p. 139-157, 2002.

WOLFE, N. D.; ESCALANTE, A. A.; KARESH, W. B.; KLBOURN, A. SPIELMAN, A. LAL, A. A. Wild primate population in emerging infectious disease research: the missing link? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 149-159, 1998.

YAMAMOTO, R. *Mollicutes*. In: BIBERSTEIN, E.L.; ZEE, Y. **Tratado de microbiología veterinária**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994, p. 241-249.

YODER, H. W., Jr. Mycoplasmosis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, H. W. Jr. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 192-196.

ZHANG, Q.; WISE, K. S. Molecular Basis Of Size And Antigenic Variation Of A *Mycoplasma hominis* Adhesin Encoded By Divergent Vaa Genes. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 891-898, 1996.

MENARD, C. BROUSSEAU, R. MOUTONS, C. Application of polymerase chain reaction of *Porphyromonas* (bacterioides) *gingivalis*. **FEEMS Microbiol. Lett.**, v. 15, n. 2, p. 163-168, 1992.