**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas**

Caracterização das espécies *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* e *Mycoplasma hominis* através do cultivo e da PCR e detecção da heterogeneidade gênica da espécie *Mycoplasma hominis* por RAPD em amostras clínicas.

LILIAN FERRI PASSADORE

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientadora:
Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha**

**São Paulo
2005**

18/184

DEDALUS - Acervo - CQ

30100010937

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P286c Passadore, Lilian Ferri
Caracterização das espécies *Ureaplasma urealyticum*,
Ureaplasma parvum e *Mycoplasma hominis* através do cultivo
e da PCR e detecção da heterogeneidade gênica da espécie
Mycoplasma hominis por RAPD em amostras clínicas / Lilian
Ferri Passadore. -- São Paulo, 2005.
87p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Cunha, Regina Ayr Flório da

1. Diagnóstico de laboratório : Medicina 2. Microbiologia
médica 3. Diagnóstico molecular I. T. II. Cunha, Regina
Ayr Flório da, orientador.

616.0756-9 CDD

LILIAN FERRI PASSADORE

Caracterização das espécies *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* e *Mycoplasma hominis* através do cultivo e da PCR e detecção da heterogeneidade gênica da espécie *Mycoplasma hominis* por RAPD em amostras clínicas.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profa. Dra. Bernadette Dora G. Melo Franco
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 08 de julho de 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório da
Disciplina de Imunologia Clínica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP,
São Paulo, SP

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser compreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto

Albert Einstein

A Deus,
por me dar força para superar todas as
dificuldades e a coragem para continuar

A minha mãe
Por tudo que ela me fez,
e pela falta que ela me faz

Aos meus pais,
pela orientação e formação

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

A minha irmã Vivian e ao meu cunhado Rogério,
Pelo apoio em todos os momentos da minha vida

A Tia Tete,
Pelo carinho e cuidado sempre recebido

Aos meus queridos sobrinhos Bárbara e Fabrício,
pela alegria de vocês existirem

A minha querida amiga Reca,
Pela sensibilidade ímpar com que soube alternar as
merecidas broncas com acolhimento e compreensão.
Se houvesse exagero em qualquer desses itens, com
certeza, nós não teríamos êxito.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Regina Aiyra Flório da Cunha, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela orientação ,e pelo exemplo de caráter e ética profissional.

A Profa. Dra. Kioko Takei, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP , pela ajuda e conselhos inestimáveis.

A Profa. Dra. Adelaide Jose Vaz, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo apoio, torcida e colaboração nas sugestões na qualificação.

A Profa. Maristela Vasconcelos, pelas observações pertinentes que fez na qualificação que ajudaram muito a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario Hirata e a Profa Dra. Rosário Hirata, da Disciplina de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, que gentilmente permitiram que eu usasse o laboratório sempre que necessitei.

Ao André do setor de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, que foi tão generoso e prestativo me ensinando e ajudando em todos os momentos.

A Diretoria do laboratório do Hospital Universitário da USP, pelo incentivo, apoio e colaboração sempre demonstrado.

A minhas parceiras tanto na vida como no trabalho do Hospital Universitário, Stella, Angélica, Cilene, Fátima, Henriqueta e Neide pelo apoio, torcida e ajuda.

Um agradecimento especial a Silvinha que sempre me ajudou nesse período tão difícil, torcendo, apoiando e ajudando e que sempre me incentivou a continuar.

A Lisinha da Bioquímica do Hospital Universitário, amiga de todas as horas.

A lára e principalmente a todos os funcionários que da coleta do Hospital Universitário, pelo voluntariado e carinho com que colheram, e cuidaram das amostras das pacientes.

A todas as pacientes que aceitaram participar e ceder gentilmente suas amostras .

A todos os amigos que me acalmaram nos momentos difíceis e que deram força para continuar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho,

Meus profundos agradecimentos .

Índice

Abreviaturas	i
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	v
Resumo.	1
Abstract	3
1 - Introdução	5
1.1 - Perspectiva histórica e considerações gerais sobre os micoplasmas	5
1.2 - Micoplasmas de interesse clínico	9
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	9
<i>Mycoplasma genitalium</i>	10
<i>Mycoplasma penetrans</i>	11
<i>Mycoplasma fermentans</i>	11
<i>Mycoplasma hominis</i>	14
Gênero <i>Ureaplasma</i> : <i>U. urealyticum</i> e <i>U. parvum</i>	19
1.3 - Aspectos gerais dos mecanismos de patogenicidade	23
1.4 - Suscetibilidade dos micoplasmas à ação dos antibióticos	27
2 - Objetivos	30
2.1 - Objetivos gerais	30
2.2 - Objetivos específicos	30
3 - Materiais e Métodos	31
3.1 - Amostragem	31
3.1.1 - Material Clínico	31

Fluxograma do processamento das amostras coletadas	32
3.2 - Cultivo de micoplasmas	33
3.2.1 - Meios de Cultura	33
3.2.2 - Semeadura	33
3.2.3 - Identificação	33
3.3 - Identificação de micoplasmas através da reação da polimerase em cadeia - PCR	35
3.3.1 – Reagentes	35
3.3.1a - Para extração	35
3.3.1b - Para reação de amplificação	35
3.3.1c - Gel de eletroforese	35
3.4 - Materiais para a realização da PCR	36
3.5 - Equipamento para a realização da PCR	36
3.6 - Processamento das amostras para realização da PCR	37
3.6.1- Extração de DNA micoplásmico	37
3.6.2- Protocolo básico empregado na realização de PCR multiplex para utilizando <i>primers</i> genéricos e <i>primers</i> para identificação de micoplasmas e primers para a identificação do DNA plasmidal pBr ₃₂₂	38
3.6.2a - DNA micoplásmico	38
3.6.2b - DNA plasmidial pBr ₃₂₂	39
3.7 -- Reação da polimerase em cadeia para a detecção de espécies de micoplasmas	39
3.7.1 – PCR específica para detecção de <i>Mycoplasma hominis</i>	39
3.7.1a - Análise da especificidade das regiões amplificadas através da utilização da enzima de restrição <i>Hind III</i>	41
3.7.2 – Reação de PCR específica para o gênero <i>Ureaplasma</i>	41
3.7.3 – Detecção do plasmídeo <i>tetM</i>	43
3.7.4 – Reação de RADP (Random Amplification of Polimorphic DNA)	44
4 - Resultados	48
4.1 - Resultados das culturas de micoplasmas	48
4.2 - PCR multiplex para a detecção de <i>Mycoplasma hominis</i>	49
4.3 - PCR específica utilizada para a identificação das espécies <i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Ureaplasma parvum</i>	51
4.4 - Resultados da reação de RAPD para a caracterização da heterogeneidade intra-espécie de <i>Mycoplasma hominis</i>	53
4.5 - PCR específica utilizada para detecção do plasmídeo “ <i>tetM</i> ” em amostras de <i>Ureaplasma</i> spp e <i>Mycoplasma hominis</i> .	54

5 - Discussão	57
6 -Conclusão	66
7- Referencias	67
Anexos	84

ABREVIATURAS

- **bp - pares de bases**
- **DNA - ácido desoxiribonucleico**
- **dNTP - desoxinucleotídeo trifosfatado**
- **DST - doença sexualmente transmitida**
- **G+C - guanina + citosina**
- **MBA- Múltipla Banda Antigênica**
- **PCR - Reação em Cadeia da Polimerase**
- **PID - Doença pélvica inflamatória**
- **RAPD - Amplificação randomizada de DNA polimórfico**
- **RNA - ácido ribonucleico**
- **TNF- fator de necrose tumoral**
- **g - grama**
- **mg - miligrama**
- **ml - mililitro**
- **µg - micrograma**
- **ng - nanograma**
- **µM - micromolar**
- **AIDS- Síndrome da Imuno deficiência adquirida**
- **VB- Vaginose bacteriana**
- **PAP - Pneumonia atípica primária**
- **SPS - polianetol sulfonato de sódio**
- **ELISA - enzima imunoensaio**

Lista de Figuras

Figura 01	Foto de colônias de <i>Mycoplasma hominis</i> em meio sólido A7.	34
Figura 02	Foto de colônias de <i>Ureaplasma</i> spp em meio sólido A7.	34
Figura 03	Foto de colônias de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> spp isoladas em meio A7.	34
Figura 04	Exemplo de uma representação esquemática de reação de RAPD onde um único <i>primer</i> se liga a várias regiões diferentes do DNA, gerando dois produtos após a amplificação (AeB).	44
Figura 05	Exemplo de uma representação esquemática de reação de RAPD onde um único <i>primer</i> se liga em várias regiões diferentes do DNA, gerando, após a amplificação, um produto (B).	45
Figura 06	Exemplo de eletroforese realizada com os dois produtos amplificados (exemplos figuras 1 e 2) demonstrando como a reação de RAPD evidencia diferenças entre membros da mesma espécie.	45
Figura 07	Gráfico dos resultados obtidos a partir dos cultivos de 163 amostras cervicais de gestantes	48
Figura 08	Distribuição das 113 amostras obtidas isoladas de material cervical de gestantes de acordo com as espécies: <i>M. hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> spp.	49
Figura 9	Resultado da PCR multiplex para identificação de <i>M. hominis</i> . Nesta reação foi utilizado como controle interno um par de <i>primers</i> para detecção do DNA plasmidial pBr ₃₂₂ que tem como produto de amplificação um fragmento de 956bp; dois pares de <i>primers</i> específicos para <i>M. hominis</i> resultando em dois produtos de amplificação sendo: um fragmento de 589 bp e outro de 334 bp. 1) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2 e 3) controles negativo e positivo respectivamente; 4	49

a 14) amostras positivas para *M. hominis*.

- Figura 10** PCR utilizando-se o par de *primers* 2 o qual originou como produto de amplificação um fragmento de 334 bp; 1 e 13) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2) controle positivo; 3 a 11) amostras positivas ;12) amostra negativa. 50
- Figura 11** Resultado da PCR onde o DNA amplificado pelo par de *primer* 2 originou em um fragmento de 334 bp o qual foi submetido à digestão pela enzima *Hind III*, resultando em dois fragmentos: 269 bp e 141 bp. 1) marcador de peso molecular $\times$ 174 bp; 2 e 3) controles positivos ; 4, 6 e 8) amostras positivas antes da digestão enzimática; 5, 7 e 9) amostras positivas após a digestão.enzimática. 50
- Figura 12** PCR empregado na detecção das espécies *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* com os *primers* UMS 125 e UMA 226; 1) marcador de peso molecular $\times$ 174bp; 2) controle positivo: *U. parvum*: fragmento 403-404 bp ; 3) controle positivo *U. urealyticum*: fragmento de 448bp; 4 a 15) resultados observados com as amostras clínicas. 51
- Figura 13** Gráfico representando a frequência de distribuição das espécies *U. parvum* e *U. urealyticum* isoladas das amostras clínicas e identificadas pela análise de MBA. 52
- Figura 14** Resultado da reação de RAPD nas amostras estudadas. 1) marcador de peso molecular de 100bp DNA Ladder; 2 a 8) amostras positivas para *M. hominis* demonstrando a heterogeneidade das cepas. 53
- Figura 15** PCR específica empregada para detecção do plasmídeo *tetM* resultando em fragmento de 397 bp 1) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2) controle positivo: *U.parvum* resistente a tetraciclina; 3) controle negativo; 4, 6,7 e 8) amostras positivas demonstrando a presença do plasmídeo *tetM*; 5) amostra negativa 55
- Figura 16** PCR específica utilizada na detecção do plasmídeo *tetM* em amostras de *Ureaplasma* spp., com amplificação do produto de 397bp 1) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2) controle negativo; 3) controle positivo: cepa de *Ureaplasma parvum* resistente a tetraciclina; 4 e 7) amostras positivas para o plasmídeo *tetM*, 5,6 e 8) amostras negativas para o plasmídeo *tetM*. 55

- Figura 17** PCR realizada para detecção do plasmídeo *tetM* com posterior digestão utilizando-se a enzima de restrição *Taq I*. O tamanho dos produtos de digestão amplificados foram: 190bp, 130 bp e 77 bp. 1) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2) controle positivo sem tratamento; 3) controle positivo após o tratamento com *Taq I*; 4) amostra positiva antes do tratamento; 5) amostra positiva após o tratamento com *Taq I*. 56
- Figura 18** Gráfico representando a porcentagem de cepas *M. hominis*, *U. parvum* e *U. urealyticum* que apresentaram o plasmídeo *tetM*. 56

Lista de Tabelas

Tabela I: Descrição das seqüências dos pares de *primers* utilizados na realização da PCR específica para identificação de *Mycoplasma hominis*40

Tabela II: Concentração dos pares de *primers* empregados na PCR específica para identificação de *M. hominis*, respectivos produtos de amplificação e referências bibliográficas40

Tabela III: Descrição do par de *primers* utilizado para biotipagem do gênero *Ureaplasma*: tamanho do fragmento e referência bibliográfica42

Tabela IV : Resultado da biotipagem das amostras positivas para *Ureaplasma* spp, através da PCR 52

Tabela V: Relação das cepas de *M. hominis* analisadas e número de fragmentos observados após realização da reação de RAPD.....54

Tabela VI : Resultado da PCR realizada na pesquisa do plamídeo *tetM*56

Resumo

O presente estudo teve como objetivo a caracterização genômica das espécies: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* em amostras cervicais de gestantes. Cepas de *Mycoplasma hominis* e de *Ureaplasma* spp., foram identificadas através do cultivo e por PCR utilizando-se *primers* genéricos e específicos. Os achados na literatura são contraditórios quanto a participação dessas bactérias nas doenças humanas, especialmente quanto a participação destas em casos de infertilidade e alterações perigestacionais. Considerando a marcante heterogeneidade das cepas de *Mycoplasma hominis*, utilizamos a reação de RAPD com a finalidade de definir os perfis genômicos das cepas isoladas. A caracterização dos biótipos 1 e 2 do gênero *Ureaplasma*, respectivamente, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, através da análise da MBA (Múltipla Banda Antigênica) por PCR, teve como finalidade determinar a predominância de cada uma dessas espécies.

Foram estudadas amostras de material cervical de 163 gestantes em várias idades gestacionais. Os resultados obtidos neste trabalho foram: *M. hominis* foi detectado em 14,7% (24/163) das amostras, sendo a RAPD realizada em 7 das amostras positivas e puras de *M. hominis*. A reação RAPD demonstrou similaridade do perfil gênico entre as amostras 3 e 4 e entre as amostras 6 e 8, enquanto que as amostras 2, 5 e 7 demonstraram uma grande heterogeneidade. O gênero *Ureaplasma* foi isolado em 54,6% (89/163) das amostras, sendo 31,5% (28/89) cepas de *U. urealyticum* e 68,5% (61/89) *U. parvum*. Foram detectados 10,4% (17/163) casos de co-infecções *M. hominis* e *Ureaplasma* spp.

O estudo da suscetibilidade das cepas isoladas frente a tetraciclina foi realizado com o intuito de se determinar a frequência de cepas resistentes a essa droga. Considerando ser este antibiótico o de eleição no tratamento das micoplasmoses humanas e devido aos altos índices de resistência apresentados, resistência esta conferida pela presença do plasmídeo *tetM*, submetemos nossas amostras à pesquisa deste plasmídeo através da PCR. A presença do plasmídeo *tetM* foi detectada em 29,5% (7/24) das amostras positivas para *Mycoplasma hominis* e em 60,7% (54/89) das

amostras positivas para *Ureaplasma* spp., sendo que dentre estas, 57,4% (31/54) foram detectados na espécie *U. parvum* e 42,6% (23/54) na espécie *Ureaplasma urealyticum*.

O estudo da heterogeneidade intra-espécie das cepas de *Mycoplasma hominis* pela técnica de RAPD é inédito no Brasil. Da mesma maneira a caracterização das espécies do gênero *Ureaplasma* em *U. parvum* e *U. urealyticum*, através da PCR pela análise da MBA, foi pioneiramente realizada pelo nosso grupo de pesquisa.

Esperamos com esse trabalho poder contribuir para um conhecimento melhor da frequência dessas espécies na nossa população e tentar explicar as divergências das avaliações nas interações entre os micoplasmas e o hospedeiro.

Abstract

The objective of this study was to characterize the species *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in cervical samples from pregnant women. Strains of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp., were identified by means of culture and by PCR using generic and specific *primers*. The findings in the literature with regard to the involvement of these bacteria in human diseases are contradictory, especially regarding their involvement in cases of infertility and perigestational changes. In view of the strong heterogeneity among *Mycoplasma hominis* strains, we used RAPD to define the profiles of the strains isolated. Biotypes 1 and 2 of the genus *Ureaplasma* – *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* respectively – were characterized by means of MBA (Multiple Banded Antigenic) analysis using PCR to determine the predominance of each of these species.

Samples of cervical material from 163 pregnant women at various stages of pregnancy were studied. The results obtained in this study were: *M. hominis* was detected in 14.7% (24/163) of the samples, and RAPD analyses carried out in 7 *M. hominis* strains. The RAPD similarly gene profile was showed: between strains 3 and 4, and between strains 6 and 8. The strains 2, 5 and 7 showed a pronounced heterogeneity in the gene profile. The genus *Ureaplasma* was isolated in 54.6% (89/163) of the samples, of which 31.5% (28/89) were *U. urealyticum* and 68.5% (61/89) *U. parvum*. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* spp., coinfection were detected in 10.4% (17/163) of the samples.

The study of the susceptibility of the isolated strains to tetracycline was carried out with a view to determining the frequency of strains resistant to this drug. As this is the antibiotic of choice in the treatment of human mycoplasmoses, and in view of the high resistance indices observed, which are conferred by the presence of the "*tetM*" plasmid, we looked for this plasmid in our samples using PCR. The presence of the *tetM* plasmide was detected 57,1% (4/7) of the *Mycoplasma hominis* – positive samples and in 40,2% (29/72) of the *Ureaplasma* spp – positive samples. Of the latter, 41,6%

(25/72) were detected in the species *U. parvum* and 33,4% (4/12) were detected in the species *Ureaplasma urealyticum*.

This is the first time that a study of the intraspecies heterogeneity of *Mycoplasma hominis* strains using RAPD has been carried out in Brazil. Characterization of the genus *Ureaplasma* species into *U. parvum* and *U. urealyticum* by means of PCR using MBA analysis was likewise pioneering effort by our research group.

We hope that our work will contribute to a greater knowledge of the frequency of these species in our population and that it will help to explain differences in the assessment of the interaction between mycoplasma and the host.

1 - Introdução

1.1 - Perspectiva histórica e considerações gerais sobre os micoplasmas

O primeiro cultivo de micoplasmas ocorreu em fins do século XIX, nos idos de 1898, proeza realizada por Nocard e Roux no Instituto Pasteur de Paris. O sucesso do isolamento em meios artificiais propiciou o desenvolvimento de métodos, cada vez mais acurados, para a identificação de novas espécies. Atualmente mais de 200 foram descritas, estando amplamente distribuídas na natureza colonizando humanos, animais, insetos e plantas (WAITES et al., 2004).

Estes microrganismos se distinguem das demais bactérias por serem desprovidos de parede celular, característica esta, única, entre os demais procariotos (ROTTEM, 2003).

A ausência total de parede celular, o polimorfismo colonial e o tamanho diminuto dessas bactérias dificultaram muito a sua caracterização. No início foram considerados vírus pois atravessavam filtros que bloqueavam a passagem de bactérias, levando alguns pesquisadores a classificá-los como tal. Contudo, após a elucidação da verdadeira natureza dos vírus ficou claro que não poderiam ser assim considerados (RAZIN, 1992)

Klienemberg (1935), trabalhando com cepas de *Streptobacillus moniliformis*, observou formas L do microrganismo, durante o cultivo do mesmo. As formas L são bactérias que perderam parcialmente ou temporariamente a parede celular e cuja morfologia colonial é muito semelhante a dos micoplasmas. Na oportunidade, Klienemberg concluiu erroneamente que as tais formas L eram micoplasmas vivendo em simbiose com *Streptobacillus moniliformis*. Muitos anos se passaram para que esse conceito equivocado fosse modificado, uma vez que seria necessário um conhecimento mais amplo sobre a natureza dos micoplasmas.

A controvérsia terminou no fim dos anos 60 com a análise de dados genômicos tais como: determinação das concentrações de guanina e citosina (C+G) e hibridização de DNA, confirmando que, contrastando com as variantes fase L de bactéria, os micoplasmas são incapazes de sintetizar os precursores de parede celular em qualquer condição (RAZIN, 1985).

Taxonomicamente foram inseridos em uma classe chamada *Mollicutes* (do latim *Molli* = macia ; *cutis* = pele) termo proposto por Edwar e Freund (1967). Atualmente uma revisão taxonômica foi realizada baseando-se na análise da fração 16S do rRNA (WAITES;TALKINGTON, 2004). A classe *Mollicutes* portanto compreende 4 ordens, 5 famílias, 8 gêneros: *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Spiroplasma*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Mesoplasma* e *Entomoplasma* que se distinguem primariamente por diferenças quanto a morfologia, tamanho de genoma e as necessidades nutricionais (LADEFOGED, 2000).

Filogeneticamente a classificação destes microrganismo não transcorreu de forma simples. Morowitz e Wallace (1937), defendiam a hipótese de serem os micoplasmas os seres mais primitivos de onde se originariam todas as outras bactérias. Foram assim colocados na raiz da árvore taxonômica. Niemark por outro lado, defendia o oposto, considerava os micoplasmas como originários de bactérias que haviam perdido parte do material genético (NIEMARK, 1986). A elucidação do impasse foi possível somente com o sequenciamento do RNA e assim foram eles classificados como sendo oriundos de bactérias, mais especificamente de bactérias Gram positivas, que sofreram degeneração em sua parede celular.

Os membros da classe *Mollicutes* são caracterizados pelo genoma diminuto cujo DNA consiste de uma única fita dupla e circular contendo de 580 a 2200 kb e baixa concentração C+G a qual varia de 23 a 40 mol%.

Uma característica interessante deste grupo de microrganismos, que os destaca dos demais, é o *stop codon*. Na maioria dos procariotos o *codon* UGA significa a interrupção da síntese protéica enquanto que para a maioria dos micoplasmas, decodifica o triptofano. Os *stop codon* dos micoplasmas são UAA e UAG (RAZIN, 1998).

A célula micoplásmica é envolta por uma membrana constituída por fosfolipídios, glicopeptídeos, colesterol e várias proteínas. O colesterol serve como um tampão que propicia alta fluidez à membrana. A falta de uma estrutura rígida, como a camada de peptidoglicano, propicia alta elasticidade e morfologia irregular, sendo essas as características responsáveis pelas dificuldades nas pesquisas sobre seu ciclo celular e sua caracterização morfológica (RAZIN, 1998).

Com o avanço nos conhecimentos sobre ultraestrutura, membrana celular, genoma e produtos metabólicos produzidos e liberados, os micoplasmas foram considerados como os menores organismos com replicação independente (RAZIN; FREUNDT, 1984). Algumas espécies patogênicas reorganizam seu DNA, por meio da replicação de seqüências gênicas através dos *transposons*, promovendo uma diversidade genética e maximizando o potencial de codificação de proteínas (WOESE et al., 1980).

O menor genoma que se auto-replica, conhecido atualmente, é o da espécie *Mycoplasma genitalium* com 580 kb. Estudos moleculares comprovaram que apesar de diminuto, o genoma deste microrganismo ainda alberga quase que o dobro do número de genes necessários para a função celular essencial (ROTTEM, 2003). A diferença substancial entre ser o menor genoma que se auto-replica *in vitro* e ser o menor genoma que se auto-replica *in vivo*, revela a necessidade de um modo de vida parasitário. O “investimento” de genes tanto para a aderência, característica essencial de um parasita, quanto para a capacidade de “driblar” o sistema imune do hospedeiro, é notável. A maioria dos micoplasmas que colonizam ou causam alguma patologia possuem as duas últimas características e já foram referidos como sendo “parasitas ideais” pois levam a infecções brandas e crônicas e dificilmente matam seu hospedeiro (RAZIN, 1998).

A despeito de seu tamanho diminuto os micoplasmas são capazes de colonizar uma grande variedade de hospedeiros causando infecções persistentes em humanos e animais. A ausência de parede celular, na célula micoplasmática, e a versatilidade da estrutura das proteínas de superfície talvez sejam cruciais para a adaptação destes organismos aos diferentes nichos dos hospedeiros e sejam fundamentais para o escape do sistema imune. A maior prova desta diversificação é,

direta ou indiretamente, a alta frequência de mutações que afetam a expressão ou estrutura dos genes que decodificam as lipoproteínas de superfície.

Os mecanismos de diversificação das proteínas de superfície dos micoplasmas são: variação de tamanho causada pelo ganho ou perda de seqüências repetitivas intra-gênicas; alteração de fase por deleção ou inserção de mutações ou inversão de DNA que afeta a promoção da atividade; expressão alterada das proteínas de superfície; e presença de múltiplas cópias de parte de genes no cromossomo micoplásmico fornecendo um reservatório genético para seqüências alternadas. A compreensão dos mecanismos moleculares da variação de fase das proteínas de superfície dos micoplasmas, é essencial para a compreensão da interação micoplasma-hospedeiro (ZHANG; WISE, 1996).

A inexistência da parede celular também isola os micoplasmas da primeira grande classificação bacteriana que é a divisão em Gram positivas e Gram negativas. Como essa classificação é determinada pela composição da parede celular ela não se aplica aos micoplasmas. Um dos maiores obstáculos nos estudos das infecções por micoplasmas é a dificuldade de cultivo *in vitro*. Há um consenso na literatura que apenas uma pequena parte dos micoplasmas existentes sejam cultiváveis. A necessidade de lipídios para o crescimento, particularmente de colesterol, é um critério taxonômico importante que distingue os que dele necessitam dos demais. Apesar de exigentes quanto aos nutrientes para crescimento é freqüente o conceito equivocado de que quanto mais rico for o meio de cultura melhor será o crescimento. As vezes ocorre o oposto, pois o excesso de um dos componentes pode ser tóxico para a célula micoplásmica. (RAZIN, 1998).

1.2 – Micoplasmas humanos de interesse clínico

Em mamíferos, incluindo os humanos, os micoplasmas parecem ter predileção por mucosas e são encontrados principalmente na boca, no trato respiratório e no trato geniturinário (LADEFOGED, 2000). Assim para compor o quadro das infecções micoplásmicas mais freqüentes no homem, se faz necessário uma breve explanação das espécies mais freqüentemente isoladas do homem.

Dentre as 16 espécies humanas isoladas podemos citar *M. pneumoniae* patógeno do trato respiratório superior e no trato geniturinário, dentre sete isoladas, quatro são potencialmente patogênicas: *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* (JUDLIN, 2002), sendo as três ultimas espécies, objetivo do presente estudo e apresentadas com maior detalhamento.

Mycoplasma pneumoniae

Mycoplasma pneumoniae é dentre as espécies de micoplasmas humanos, a mais bem estudada. Foi inicialmente isolado em cultura de células de escarro obtida de paciente com uma doença pulmonar incomum (EATON et al., 1944). Após estudos a patologia foi chamada de pneumonia atípica primária (PAP).

A denominação pneumonia atípica se referia a uma pneumonia com sintomas respiratórios brandos e com desproporcional infiltração pulmonar observada através de raio X. A falência do tratamento com os antimicrobianos até então utilizados: penicilinas e sulfonamidas contrastava com o tratamento de escolha nas pneumonias.

O termo “primária” foi estabelecido por acreditar-se que seria esta a primeira etiologia incerta das doenças pulmonares.

As infecções causadas por *M. pneumoniae* em crianças com menos de cinco anos de idade são, na maioria dos casos, brandas e auto-limitantes. Contudo, crianças

em idade escolar e adultos podem apresentar sinais clínicos mais severos, combinados com uma fase de convalescença prolongada. Re-infecções são comuns.

Aproximadamente 25% das pessoas infectadas por *M. pneumoniae* podem apresentar complicações extra-pulmonares. As complicações no sistema nervoso central (SNC) são as manifestações mais comuns. Além destes, outros sítios podem ser afetados, entre eles: sangue, líquido sinovial, líquido pericárdico e pele (WAITES; TALKINGTON, 2004).

Mycoplasma genitalium

O primeiro isolamento desta espécie ocorreu em 1981 (TULLY et al., 1981), e foi realizado a partir de amostras de uretras de 13 homens com uretrite não gonocócica (UNG). Inúmeras tentativas de isolar esse agente utilizando meios artificiais tem falhado. Com o advento da biologia molecular é possível estudar e redefinir o papel desta bactéria na etiologia das doenças do trato genital. Pesquisas indicam uma frequência maior desta bactéria em uretras de homens com UNG do que em homens assintomáticos (TAYLOR-ROBINSON; FURR, 1998). A associação da espécie *M. genitalium* com doenças é também confirmada pela detecção de títulos de anti-*M. genitalium* mais altos no soro de pacientes que apresentam uma reação de PCR positiva para esta bactéria quando comparado à homens com reação de PCR negativa para esta espécie (CORDOVA et al., 2000)

Em mulheres *M. genitalium*, diferentemente do *M. hominis*, não está associado com vaginose bacteriana. No entanto foi detectado por PCR em 7 a 20% das mulheres atendidas em clínica de DST estando associado a cervicites (TAYLOR-ROBINSON; FURR, 1998).

Mycoplasma penetrans

Mycoplasma penetrans é o mais recente micoplasma isolado do homem (Lo et al., 1991). Foi detectado em amostras de urina de seis indivíduos com AIDS não tendo sido encontrado em indivíduos HIV negativos. Segundo Taylor-Robinson e Furr (1998), este micoplasma encontra-se sorologicamente associada com HIV e com sarcoma de Kaposi .

Esta espécie apresenta uma habilidade inquestionável de penetrar ativamente em células de mamíferos. Os mecanismos pelos quais os micoplasmas penetram nas células se mantêm obscuros. Enquanto algumas espécies possuem uma estrutura especializada para esta função, como o que ocorre com as espécies *M. penetrans* e *M. genitalium*; outras que não a possuem também apresentam capacidade de invadir as células.

É importante enfatizar que a localização intracelular dos micoplasmas protege-os do ataque do sistema imune do hospedeiro e da ação de antibióticos sendo um importante fator de virulência, comumente observado em outros microrganismos (RAZIN, 1998).

Mycoplasma fermentans

Desde seu primeiro isolamento em trato urogenital humano, fato esse que ocorreu no início da década de 50 (RUITER et al., 1952), *M. fermentans* não tem sido freqüentemente isolado deste sítio. Recentemente, com o advento da biologia molecular, este microrganismo tem sido detectado em urina, sangue periférico, células mononucleares e orofaringe em proporções que variam de 5% a 20%. Ao se comparar a freqüência de isolamento de *M. fermentans* em indivíduos homossexuais, com e sem HIV, estudos concluíram que ambos os grupos apresentavam freqüências semelhantes. A idéia de que esta espécie é de comportamento comensal foi reforçada em um estudo onde foi detectada por PCR, em orofaringe e urina, em 20% de estudantes de medicina saudáveis. O furor inicial de que esta espécie estaria atuando como co-fator

do HIV em pacientes com AIDS diminuiu, não estando bem estabelecida sua participação na associação com o HIV.

Anualmente ocorre no mundo aproximadamente 13 milhões de nascimentos prematuros, dos quais um terço é proveniente de uma gravidez sem complicações com nascimentos prematuros espontâneos. O nascimento prematuro é a maior causa de morbidade e mortalidade neonatal, e é responsável por até 90% de todos os óbitos, excluindo problemas de má formação congênita, e por 50% de todos os distúrbios neurológicos infantis (KENYON et al., 2001). Apesar da mortalidade infantil ter diminuído drasticamente nos últimos anos, a porcentagem de partos prematuros, e nascimento de crianças de baixo peso, pesando menos que 2500g, têm aumentado. A diminuição da mortalidade infantil está associada a uma melhora nas unidades de terapia intensiva neonatal e a um tratamento mais efetivo das síndromes respiratórias. No entanto, o tratamento dos nascidos prematuros e de crianças de baixo peso, continua um problema sem solução. Este problema é mais agudo nas minorias raciais como por exemplo: mulheres negras tem aproximadamente o dobro de nascimentos prematuros e de crianças de baixo peso quando comparadas com mulheres brancas. Apesar do impacto que o nascimento prematuro tem, as causas permanecem inexplicáveis (PAIGE et al., 1998), sendo a prevenção do nascimento prematuro um problema de saúde pública. Infelizmente presumir se uma mulher grávida vai ter um parto prematuro é difícil, o que impossibilita a prevenção. Nascimento prematuro é definido como a contração uterina regular e progressiva após alterações da região cervical antes da gestação completar 37 semanas. O nascimento prematuro está ainda associado com vaginose bacteriana (VB) e infecção intra-uterina (TARA; THORNTON, 2004). VB é uma condição caracterizada por uma mudança no ecossistema da vagina, e está presente em de 15% a 20% das mulheres grávidas sendo um fator de risco para nascimento e ruptura prematura das membranas e endometrite pós-parto. As mudanças no ecossistema bacteriano é caracterizada por diminuição do número de lactobacilos e aumento de vários anaeróbios e aeróbios facultativos como *Mobiluncus* spp., *Prevotella* spp., *Gardnerella vaginalis* e micoplasmas genitais: *Mycoplasma hominis* e espécies do

gênero *Ureaplasma*. A despeito do aumento substancial na concentração de microrganismos, tem sido observado que VB não está associada com sinais inflamatórios (aumento do número de leucócitos) diferindo assim a vaginose da vaginite. O motivo da ausência de uma resposta inflamatória local na VB não foi determinado. É evidente que a mucosa vaginal é capaz de instalar uma resposta inflamatória; infecções por *Trichomonas vaginalis* e *Candida* spp., causam uma intensa resposta inflamatória com manifestação clínica de vaginite. A causa da VB é desconhecida e 50% das pacientes são assintomáticas (ROMERO et al., 2004).

Donders et al. (1998), realizaram estudo quanto a participação dos micoplasmas genitais em abortos espontâneos, e concluíram que VB, principalmente relacionada com *G. vaginalis* e micoplasmas genitais, aumenta em cinco vezes o risco de aborto espontâneo e indica o tratamento com antibióticos assim que forem diagnosticados estes microrganismos.

A colonização do trato urogenital por *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp., aumenta durante a gravidez. Esse aumento pode estar relacionado com alterações hormonais e imunológicas que ocorrem na mulher grávida. Iwasaka et al. (1986), relataram que o estrógeno aumenta a colonização vaginal de ratas por *Ureaplasma* spp., e que nas mulheres a colonização também está associada à sua condição hormonal. No entanto essa influência não foi demonstrada para *Mycoplasma hominis*. Em mulheres, o aumento da colonização por *M. hominis*, infecção por *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e sorologia positiva para sífilis está associado a um início precoce da atividade sexual. Esses achados sugerem que o *M. hominis* possa ser transmitido sexualmente (LUTON et al., 1994).

Mycoplasma hominis

A primeira publicação sobre um micoplasma isolado de humanos ocorreu em 1937 e foi realizada por Dienes e Edsal. O organismo foi recuperado, de uma cultura aparentemente pura, de abscesso na glândula de Bartholin. Não havia como identificar qual espécie de micoplasma era, porém acredita-se tratar-se de *Mycoplasma hominis* em decorrência da morfologia colonial característica e da frequência com que esse agente é isolado no trato genital (ELSHIBLY et al., 1996).

Esse isolamento iniciou uma nova fase na micoplasmologia. Até então os micoplasmas só haviam sido isolados de animais, e o isolamento em humanos despertou o interesse de vários microbiologistas no estudo da espécie.

A primeira pergunta que devemos responder ao iniciar é: *Mycoplasma hominis* é um patógeno humano? A pergunta é pertinente apesar dos quase 70 anos transcorridos de seu primeiro isolamento, pois na literatura ainda ocorrem controvérsias a respeito do seu significado patogênico em infecções do trato urogenital (AYRA et al., 2001). Existe, no entanto, evidências substanciais que associam esta espécie às patologias do trato geniturinário feminino (LADEFORGED, 2002).

A segunda pergunta que devemos responder é: por que anos após o primeiro isolamento e com inúmeros trabalhos posteriores, nos quais fica evidente a participação desta espécie como agente patogênico, ainda restam algumas dúvidas quanto a sua patogenicidade? Uma resposta poderia ser o fato desta espécie ser isolada em mulheres assintomáticas. Contudo, em casos de mulheres com vaginose bacteriana, a frequência de isolamento, quando comparado com mulheres assintomáticas denota uma prevalência inquestionável. Além deste fato o isolamento de *M. hominis* está associado a um aumento significativo da frequência de nascimentos prematuros em mulheres que albergam essa bactéria quando comparado com mulheres que não albergam (TAYLOR-ROBINSON; FURR, 1998).

Em estudo realizado, relacionando a frequência de isolamento de *M. hominis* com a atividade sexual das participantes, os pesquisadores concluíram que a transmissão desta espécie segue os mesmos padrões observados com outros

organismos sabidamente de transmissão sexual, sugerindo assim que a transmissão desta espécie seja sexual (ELSHIBLY et al., 1996). Estudos demonstraram que a incidência de *M. hominis* em pessoas sem atividade sexual é muito baixa. Em pessoas sexualmente ativas a presença desta espécie no trato urogenital aumenta a probabilidade de isolamento de outros microrganismos sexualmente transmitidos, quando comparado com pessoas que não albergam o micoplasma (KOCH et al., 1997).

Em estudo epidemiológico realizado por Ladefoged (2000), foi observado que *Mycoplasma hominis* pode ser detectado em diversos órgãos e tecidos do corpo humano tais como: trato geniturinário, sistema pulmonar, nervoso, cardiovascular e músculo esquelético, podendo ser considerado responsável por alguns casos de pielonefrite, abortos, nascimentos de prematuros, doença pélvica inflamatória, vaginoses, doenças respiratórias em recém-nascidos e adultos, meningites infantis, infecções prostáticas, septicemias, peritonites e artrites.

A ocorrência desta espécie em sítios extra-genitais é bem menos freqüente. A bacteremia ocorre em recém nascidos e em mulheres que foram submetidas a traumas, obstruções, cirurgias e endometrites pós-parto. Não há a menor dúvida que as bacteremias causadas por *M. hominis* são sub-diagnosticadas, uma vez que o laboratório clínico de rotina não possui os meios adequados que propiciam seu crescimento. Apesar dos equipamentos automatizados possuírem meios de cultura enriquecidos e que são capazes de propiciar o crescimento de um grande número de microrganismos, não são capazes de promover o crescimento da espécie *M. hominis* pois o anti-coagulante de escolha (em todos os meios comerciais) é o polianetol sulfonato de sódio (SPS) que é tóxico para esta espécie (WAITES;CANUPP, 2001). *Mycoplasma hominis* foi ainda detectado, por PCR, do sangue de um paciente com endocardite submetido a cirurgia cardíaca há seis meses. Infecções cardiovasculares causadas por micoplasmas são raramente descritas, contudo é importante tal diagnóstico uma vez que a evolução da doença pode ser fatal, requerendo uma terapia antibiótica adequada e específica (FENOLLAR et al., 2004).

Em estudo realizado por Waites et al. (1990), *M. hominis* foi isolado em líquido de 9 recém nascidos em 318 estudados. Este índice, altíssimo quando comparado com a literatura, foi devido ao tipo de pacientes escolhidos para a pesquisa. Eram pacientes

de alto risco nascidos de mulheres, de baixo nível sócio econômico, que não realizaram exames pré-natais.

Em gestantes esse microrganismo foi isolado em líquido amniótico e secreção cervical sendo que uma parte significativa dessas pacientes tiveram parto prematuro (CASSELL et al., 1983). Perni et al. (2004), também relataram que a presença de *M. hominis* no líquido amniótico, no segundo trimestre de gestação é um fator de risco para o rompimento prematuro de membranas .

Alguns autores postulam que mulheres com vaginose bacteriana após a 16ª semana de gestação tenham cinco vezes mais probabilidade de um parto prematuro que as não infectadas (HAY et al., 1994). *Mycoplasma hominis* foi detectado em 10% das mulheres que tiveram febre puerperal ou febre pós parto e não foram isolados de pacientes afebris com aborto ou em gestantes saudáveis (TAYLOR-ROBINSON; MUNDAY, 1988). Além disso apresenta-se como possível agente etiológico de infecções do trato respiratório de recém nascidos podendo evoluir, em alguns casos, até meningite por infectar o sistema nervoso central (TAYLOR-ROBINSON, 1996 a). Allonso-Vega et al. (1997), relataram um caso raro onde uma criança nascida a termo, em uma gestação normal, desenvolveu meningite com 20 dias de vida e faleceu 13 dias depois. *M. hominis* foi o único agente etiológico repetidamente recuperado do líquido cefalorraquiano e do tecido cerebral, após a morte da criança. Esse achado demonstra que esta bactéria deve ser pesquisada em crianças e recém nascidos que apresentarem sinais clínicos de meningite com cultura de líquido cefalorraquiano negativa.

Existem também evidências do seu envolvimento em casos de doença pélvica inflamatória (PID), constatado através de seu isolamento em 10% das pacientes com salpingite, diagnosticadas por laparoscopia (HENRY-SUCHET et al., 1980). Pacientes com infecções invasivas por *M. hominis*, quase sem exceção, apresentam soroconversão ou significativo aumento no título de anticorpos os quais podem ser detectados através de testes de inibição metabólica ou enzima imunoensaio (ELISA) (BROWN et al., 1987).

Com o advento das técnicas de biologia molecular tem sido observado um grande avanço no diagnóstico das infecções invasivas causadas por *Mycoplasma*

hominis (RAZIN, 1998). Embora todas essas evidências reforcem o potencial patogênico desta espécie, não há uma resposta efetiva ao que se refere a segunda pergunta sobre a patogenicidade.

Uma das possíveis razões dessa dubiedade, quanto ao papel patogênico do *Mycoplasma hominis*, seja a heterogeneidade da espécie. Nicol e Edward (1953), 17 anos após o primeiro isolamento do microrganismo, foram os primeiros a sugerir a aglutinação em tubo como método de diferenciação de várias cepas de *Mycoplasma hominis*.

Edward (1955), baseando-se nos dados obtidos anteriormente, propõe uma subdivisão da espécie *M. hominis* em tipo 1 e tipo 2. Contudo em 1956, em um estudo mais aprofundado o próprio autor concluiu não haver dois tipos da espécie *M. hominis* justificando a subdivisão inicial a erros na manipulação do microrganismo.

Apesar desta confusão inicial o conceito da heterogeneidade intra-específica das cepas de *M. hominis* não foi afetado (FREUNDT, 1983).

Assim, novamente em 1968, RAZIN sugeriu que a espécie *M. hominis* fosse subdividida. Os autores Lin e Kass (1974), propuseram a subdivisão sorológica de *M. hominis* em 7 sorogrupos diferentes. Contudo, tentativas de subdivisão nunca foram plenamente aceitas.

Christiansen et al. (1987), utilizando uma sonda genética para detecção de *Mycoplasma* spp., observaram que a espécie *M. hominis* apresentava grande polimorfismo.

Jensen et al. (1998), estudando cepas de *M. hominis*, isoladas de sítios diferentes da mesma mulher e cepas isoladas de mulheres diferentes, por metodologias *SDS-PAGE* e *pulsied-field* gel eletroforese concluíram que as cepas isoladas da mesma paciente eram praticamente homólogas em contraposição com as cepas isoladas de mulheres diferentes, as quais eram heterogêneas. Diante disto, os autores correlacionaram a heterogeneidade da espécie a uma capacidade personalizada de adaptação ao sistema imune do hospedeiro.

Vários são os métodos utilizados para detecção de diversidade gênica de micoplasmas isolados de materiais clínicos. Dentre eles podem ser citados: análise de restrição, eletroforese de campo reverso, *pulsied-field* eletroforese, AFLP (*amplified*

fragment length polymorphism), hibridização DNA-DNA e análise do DNA por enzima de restrição (BLANCHARD et al., 1993). Estas análises, de um modo geral, requerem um longo tempo de execução, muito material biológico e seus resultados são difíceis de interpretar.

Considerando ser a RAPD uma metodologia promissora como marcador de cepas bacterianas e considerando a discutida heterogeneidade da espécie *Mycoplasma hominis* introduzimos, de maneira pioneira no Brasil, para análise de cepas de *M. hominis* isoladas de amostras clínicas.

Gênero *Ureaplasma*: *U. urealyticum* e *U. parvum*

Ureaplasma urealyticum foi primeiramente isolado por Shepard (1954), de paciente com uretrite não gonocócica (UNG) primária e recorrente. Estes organismos foram inicialmente denominados de “T-strains” (T de “tiny”= pequeno) e posteriormente foram chamados de micoplasma-T ou cepas T de micoplasma, devido ao tamanho diminuto de suas colônias (7 a 15µm de diâmetro).

Em 1974 pesquisadores, que trabalhavam com o microrganismo realizando estudos sobre a função biológica e sorológica do mesmo, chegaram ao consenso da criação do novo gênero *Ureaplasma*, designando *Ureaplasma urealyticum* como a espécie humana. Ureaplasmas também são isolados de outros animais, podendo ser citados: *U. diversum*, *U. gallorale*, *U. felinum* e *U. canigenitalium* que são isoladas respectivamente do gado bovino, aves, gatos e cães (KRAUSE: TAYLOR-ROBINSON, 1992).

As espécies do gênero *Ureaplasma* spp., possuem uma característica única dentre os micoplasmas de origem humana que é a metabolização da uréia, principal fonte de energética metabólica (BLANCHARD et al., 1988). Essa característica importante foi descoberta independentemente por Purcell et al. (1966), e por Shepard em 1966. A propriedade de metabolizar a uréia associada a incapacidade de fermentar carboidratos propiciaram a detecção e identificação dos ureaplasmas estimulando os pesquisadores a estudar as espécies do gênero (STYLER; SHAPIRO, 1985).

Embora a urease esteja presente em uma grande variedade de bactérias, os ureaplasmas são os únicos organismos conhecidos que dependem da uréia como substrato para crescimento. (BLANCHARD et al., 1988).

Ureaplasma urealyticum, comensal do trato urogenital de mulheres sexualmente ativas, isolado em até 80% de mulheres assintomáticas (SÁNCHEZ et al., 1987), tem a etiologia reconhecida em casos de UNG e infecção disseminada em pacientes imunocomprometidos. (ZHENG et al., 1995). Relatos remarcam ainda seu envolvimento em complicações durante a gravidez, incluindo corioamnionite,

nascimento prematuro, doenças pulmonares crônicas em recém-nascidos (KONG et al., 1999).

Nas mulheres, *Ureaplasma* spp., é isolado das trompas de Falopio de pacientes com doença pélvica inflamatória, não estando porém certa a sua participação como agente etiológico da doença. Considerações análogas podem ser feitas quanto sua participação na infertilidade de homens e mulheres. *Ureaplasma* spp., tem sido isolado mais freqüentemente em casos de abortos espontâneos e nascimentos prematuros do que em casos de abortos induzidos ou causando doenças em recém nascidos. (TAYLOR-ROBINSON; FURR, 1997)

O isolamento de *Ureaplasma* spp., em cultura pura, obtida de material placentário, líquido amniótico, órgãos internos do feto na presença de funiculite, pneumonia e a detecção de imunoglobulina específica IgM são fortes evidências de que a infecção ocorre dentro do útero. Cassell et al. (1993) isolaram *Ureaplasma urealyticum* em mais de 14% dos recém nascidos de baixo peso (inferior a 2.500g) a partir do material endotraqueal obtido nas primeiras 24 horas do nascimento. Considerando que essas crianças haviam nascido de cesariana fica assim confirmada a transmissão intra-uterina sobretudo em crianças prematuras, sendo a colonização de recém nascidos a termo, transiente.

A ascensão da infecção placentária ocorre rapidamente após a ruptura das membranas. Esse possível início da infecção é particularmente importante na tecnologia da reprodução assistida, uma vez que os procedimentos padrão de lavagem do sêmen poderão ou não remover esse agente infeccioso (KNOX et al., 2003).

Outras complicações da gravidez causadas por *Ureaplasma* spp., são displasia broncopulmonar neonatal (ALFA, et al., 1994), e septicemia relatadas por Brus et al. (1991). O poder invasivo do microrganismo poderá levar também à alterações do sistema nervoso central (HEGGEI et al., 1994).

A presença desse microrganismo em pacientes sintomáticos e assintomáticos tem dificultado a determinação de sua etiologia em várias doenças. Tal diversidade de comportamento pode estar relacionada a diferenças genéticas e à concentração de microrganismos presentes (CUNHA et al., 1997).

Inicialmente *U. urealyticum* foi dividido em 14 sorotipos utilizando-se vários métodos sorológicos. Os sorotipos foram agrupados em dois “clusters” ou biótipos. Biotipo 1 agrupava quatro sorotipos: 1,3, 6 e 14, e o biotipo 2 agrupava 10 sorotipos: 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10,11,12 e 13 (ROBERTSON et al., 1982). A dificuldade de se atribuir ao *U. urealyticum* um papel etiológico em determinadas doenças humanas poderia ser decorrência dessa grande heterogeneidade das espécies.

Há anos os pesquisadores tentam associar um sorotipo particular do gênero *Ureaplasma* com doenças. Estudos sobre a participação de *U. urealyticum* em doenças do trato urinário revelaram uma maior predominância do sorotipo 6. Outros trabalhos demonstraram estatisticamente a associação do sorotipo 4 com abortos recorrentes. Apesar destes achados não há uma evidência conclusiva associando um sorotipo particular a uma doença. Em parte isso é reflexo da dificuldade de interpretação dos resultados de tipagem sorológica. Reações cruzadas são comuns e as amostras clínicas freqüentemente contém dois ou mais sorotipos que não são facilmente separados (PITCHER et al., 2001).

Considerando que certas doenças são atribuídas mais freqüentemente a uma sorovariedade do que à outras (ABELE-HORN et al., 1997), vários métodos foram descritos para justificar essas diferenças, incluindo perfil enzimático (DAVIS; VILLANUEVA, 1990), análise de proteínas e epítomos antigênicos, (TENG et al., 1994), hibridização de DNA (CHRISTIANSEN et al., 1981), gel de eletroforese uni e bi-dimensional (SWENSON et al., 1983), amplificação através de PCR de genes específicos (BLANCHARD, 1990), entre outros.

Nos anos 90, foi descoberto um antígeno que foi chamado de múltipla banda (MB), o qual estava presente em diferentes tamanhos e em diferentes isolados clínicos. Este antígeno MB possui características peculiares e importantes: são espécie-específicos; ambos contém especificidade sorotípica e epítomos reativos que reagem cruzadamente, isto é, podem ser reconhecidos por ambos: os sorotipo-específicos e anticorpos monoclonais (MBbs) que reagem cruzadamente. São produzidos tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”; apresentam altas taxas de variação de tamanho “*in vitro*”; estão presentes em tamanhos variados nos diferentes isolados de ureaplasmas invasivos, ou seja, de placenta, tecido pulmonar e líquido cefalorraquiano; é o antígeno predominante

durante as infecções humanas. Em estudo utilizando anticorpos monoclonais contra estes antígenos (MB) foi demonstrada a inibição do crescimento dos microrganismos, provando assim, a importante ação deste antígeno para o sistema imune do hospedeiro (ZHENG et al., 1995).

Baseado nos estudos de Zheng (1995), Kong et al. (2000), foi proposta a divisão da espécie *Ureaplasma urealyticum* em: *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*. *U. parvum* compreenderia o antigo biotipo 1 e *U. urealyticum* o biotipo 2. Além disso os pesquisadores propuseram um esquema de subtipagem das duas novas espécies por PCR, o que viria facilitar a tipagem destas, uma vez que a tipagem sorológica é dispendiosa e pouco específica.

Fica claro, portanto, a importância da distinção das espécies do gênero *Ureaplasma* nas amostras clínicas. A caracterização de espécies prevalentes em nossa população, em um primeiro momento, poderá contribuir para uma melhor correlação entre a presença do microrganismo e as manifestações clínicas.

1.3 – Aspectos gerais dos mecanismos de patogenicidade dos micoplasmas

Devido ao caráter crônico e brando das infecções micoplásmicas no homem e pelo fato destes microrganismos, de modo geral, não expressarem super-antígenos e não produzirem potentes toxinas, pode-se erroneamente concluir que não possuem um mecanismo de patogenicidade definido.

Um aspecto fundamental para a definição de um patógeno como agente etiológico de uma doença é o seu mecanismo de patogenicidade. Embora muitas espécies de micoplasmas sejam comensais, tanto na cavidade oral como em outros sítios, certas espécies são capazes de penetrar na corrente sanguínea. À algumas espécies colonizadoras do trato urogenital, como *Ureaplasma* spp., e *Mycoplasma hominis*, também é atribuído um potencial patogênico podendo exercer um papel etiológico em pielonefrites, doença inflamatória pélvica (PID) e febre pós-parto e pós-aborto. Além disso estão envolvidos em algumas doenças graves como : septicemia, artrite séptica, meningite neonatal e encefalite, como demonstrado em ensaios “*in vivo*” com animais (NICOLSON et al., 1998).

Algumas doenças tais como: a síndrome da guerra do Golfo, síndrome da fadiga crônica, doença de Crohn e algumas artrites, cuja etiologia não está determinada, têm nos micoplasmas um possível agente etiológico (RAZIN, 1998)

A possibilidade ainda dos micoplasmas atuarem como co-fatores na AIDS tem despertado o interesse de muitos pesquisadores principalmente nas espécies *M. penetrans* e *M. fermentans*. Apesar de muito ter sido descoberto a respeito destas espécies há necessidade de intensificação dos estudos para confirmar e definir a participação destes microrganismos na AIDS (GRAU et al., 1994).

Considerando que durante o processo evolutivo os micoplasma perderam os genes necessários para a síntese de vários nutrientes essenciais para seu crescimento, eles foram obrigados a obter dos hospedeiros o que não são capazes de sintetizar.

A eliminação de produtos tóxicos, resultante de sua metabolização, por espécies oxidativas tais como *M. pneumoniae* e *M. genitalium*, afetam as células hospedeiras por produzirem peróxido de hidrogênio e radicais superóxidos. A amônia, produto da hidrólise da uréia pela enzima urease, sintetizada pelo *Ureaplasma* spp., é

um fator de patogenicidade pois causa dano aos tecidos adjacentes à colonização ureaplásmica (RAZIN, 1998).

Outro fator de patogenicidade atribuído ao gênero *Ureaplasma* spp., é a ação na síntese de prostaglandinas podendo levar a nascimentos prematuros. As fosfolipases A e C, sintetizadas pelos ureaplasmas são enzimas catalisadoras que participam do metabolismo dos fosfolipídeos (DE SILVA; QUINN, 1991). A fosfolipase ureaplásmica pode liberar grande quantidade de ácido aracdônico, resultando na inibição da síntese de prostaglandinas, explicando a participação dos ureaplasmas em problemas gestacionais. Os ureaplasmas também sintetizam uma protease que atua na molécula dimérica IgA, cindindo-a propiciando a permanência e posterior invasão do trato geniturinário (GLASS et al., 2000). A presença da MBA (múltipla banda antigênica) nas espécies do gênero *Ureaplasma* também tem sido considerada como um fator de virulência (KONG et al., 1999).

A ausência da parede celular dos micoplasmas proporciona um contato tão íntimo, entre estes e a membrana da célula hospedeira que pode resultar em uma fusão, talvez transitória, entre as duas membranas. Este contato resulta em trocas entre os componentes das membranas fazendo com que possa haver uma aquisição de antígenos micoplásmicos pela célula do hospedeiro e vice-versa. Aberrações cromossômicas e alterações na morfologia são observadas em culturas de células contaminadas por micoplasmas há muito tempo (CUNHA, 1997). Essa ação levanta uma questão importante da participação destes organismos em processos oncogênicos. Muitos argumentos reforçam esta idéia. Os micoplasmas talvez sejam os únicos procariotos que cresçam “simbioticamente” com células eucarióticas. A ligação íntima do micoplasma com as células do hospedeiro pode iniciar uma cascata de sinais alterando a função de muitos genes (RAZIN, 1998).

A adesão dos micoplasmas à célula hospedeira é um importante pré-requisito para a colonização e para a infecção. Tal adesão se dá através de receptores específicos e/ou de adesinas presentes em algumas espécies. A adesina mais estudada dentre os micoplasmas é a encontrada na espécie *M. pneumoniae* (P1) que se caracteriza por ser uma organela que tem como função principal a adesão à célula hospedeira. Alguns autores sugerem que a expressão da proteína P1 sozinha não é

suficiente para mediar a aderência do *M. pneumoniae* havendo uma atividade cooperativa de outras proteínas tais como a P30. Esta proteína é responsável tanto pela motilidade deslizante como pela divisão celular com biogênese da organela de fixação. Além da P30 outras proteínas de alto peso molecular participam da composição da estrutura polar (ROTTEM, 2003). Nas espécies do gênero *Ureaplasma* uma estrutura denominada glicocálice parece ser a responsável pela aderência (DE SILVA ; QUINN, 1993).

Dentre os receptores da célula hospedeira, responsáveis pela adesão micoplásmica, estão os sialoglicoconjugados e glicopeptídeos. A estrutura responsável pela adesão do *M. hominis* à célula hospedeira é provavelmente uma lipoproteína de membrana modificada. A idéia de que esta lipoproteína modificada seja também uma proteína de variação de fase está recebendo subsídios experimentais. Para o microrganismo, um fator de adesão variável, ou seja, que pode mudar de forma é extremamente útil quando se pensa nas diferentes células hospedeiras às quais ele pode aderir possuindo esta flexibilidade de expressão.

As proteínas de variação de fase situam-se na superfície da membrana podendo ser expressas de duas maneiras: uma como resposta a um estímulo do hospedeiro e outra como resultado de mudanças espontâneas da população microbiana e gerando randomicamente distintas populações celulares com diferentes fenótipos antigênicos. Considerando que os maiores alvos do sistema imune dos hospedeiro são as organelas de superfícies, a capacidade do microrganismo em alterar rapidamente os antígenos expressos, oferece vantagens inquestionáveis para evasão da resposta imune.

A despeito de seu genoma limitado os micoplasmas são capazes de uma diversificação antigênica da superfície celular impressionantemente grande. Nas demais bactérias e parasitas é comum que determinações antigênicas diferentes sejam decodificadas por diferentes genes normalmente organizados em diferentes famílias. A estratégia utilizada pelos micoplasmas para produzir uma alta heterogeneidade antigênica com um genoma reduzido está voltada para a capacidade de cada gene individualmente oscilar entre um “liga” e “desliga” conjuntamente com sua capacidade

de produzir diferentes produtos de diferentes tamanhos, resultando em um grande repertório antigênico diferente na superfície da célula micoplásmica.

A capacidade dos micoplasmas modularem a resposta imune do hospedeiro contribui para suas propriedades patogênicas, habilitando-os tanto à evasão quanto a supressão dos mecanismos do sistema imune, estabelecendo assim o aspecto crônico das infecções micoplásmicas (RAZIN, 1998).

1.4 – Susceptibilidade dos micoplasmas à ação dos antibióticos

Raramente a infecção micoplásmica é sugerida como hipótese diagnóstica. Considerando-se que tais infecções tem sido identificadas em pacientes crônicos estas podem ser tratadas com sucesso se o tratamento for longo o suficiente para eliminar as formas dormentes do microrganismo. Usando esta estratégia, o tratamento apropriado com antibióticos pode resultar em uma melhora do estado geral do paciente e até na recuperação total do mesmo (NICOLSON et al., 1998)

Stylder e Shapiro (1985) ao analisarem vários trabalhos, que correlacionavam a infecção micoplásmica em casais inférteis com tratamento antimicrobiano utilizando tetraciclina ou doxiciclina, obtiveram resultados ambíguos. Em alguns estudos o tratamento aumentava a fertilidade em até 29% dos casos, enquanto que em outros, não havia diferença entre os grupos inférteis tratados e os não tratados. Essa ambigüidade pode ser explicada pelo fato de outros microrganismos, além dos micoplasmas, estarem envolvidos neste processo. Por outro lado no que se refere a freqüência de isolamento dos micoplasmas, em todos os estudos foi reportado que esta era maior em casais inférteis que nos férteis.

Embora o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos micoplasmas varie muito com a espécie, alguns antibióticos são mais freqüentemente utilizados na terapêutica (TAYLOR-ROBINSON; BÉBÉR, 1997).

Embora sendo sensíveis a vários antibióticos de largo espectro, as tetraciclina e a doxiciclina são utilizadas na maioria das infecções micoplásmicas, sendo esta última menos ativa, segundo Hannan e Woodnutt (2000).

Os macrolídeos tais como: eritromicina, clindamicina, lincomicina, rifampicina e azitromicina podem ser utilizados como alternativa terapêutica (TAYLOR-ROBINSON; FURR, 2000).

Tem sido observada uma resistência à rifampicina a qual parece estar relacionada com a presença de um único aminoácido na posição 526 na subunidade β da RNA polimerase.

Raherison et al. (2002) constataram resistência às fluorquinolonas em cepas de *M. hominis*. Estudando o mecanismo de resistência destas cepas à ciprofloxacina

os pesquisadores observaram dois mecanismos diferentes: um previamente conhecido e que consistia na alteração do alvo de atuação do antibiótico, a topoisomerase II, e um outro mecanismo denominado “efluxo ativo da droga”. Este último já foi encontrado em diversas espécies bacterianas, Gram positivas e Gram negativas, sendo energia-dependente. A bomba de efluxo atua frente a múltiplas drogas sendo capaz de transportar diversas classes de antibióticos para fora de célula bacteriana tendo como consequência a multi-resistência.

A resistência intrínseca dos micoplasmas às penicilinas e às cefalosporinas é decorrência de uma característica morfológica peculiar dos micoplasmas: ausência da parede celular.

Após insucessos na terapia antimicrobiana, estudos sobre mecanismos de ação das drogas, regulação de expressão gênica e presença de determinantes de resistência, mostram que a aquisição de novos genes estão freqüentemente associados a presença de plasmídeos ou de *transposons*.

A resistência à tetraciclina, por exemplo, é codificada por diferentes determinantes genéticos. Cinco destes, *tetA* a *tetF*, são exclusivos das bactérias Gram positivas, enquanto que 4, *tetK*, *tetL*, *tetN*, e *tetP* só foram descritos para bactérias Gram negativas. Os plasmídeos *tetO* e *tetM* foram encontrados tanto em bactérias Gram positivas como nas Gram negativas.

Roberts et al. (1985) pesquisando cepas de *Mycoplasma hominis* isoladas de pacientes e resistentes à tetraciclina isolaram um plasmídeo de resistência o qual possuía uma seqüência de DNA homóloga ao *tetM*. Esta foi a primeira descrição da presença do plasmídeo *tetM* em um gênero não correlacionado sugerindo que o plasmídeo *tetM* tenha sido transferido do *Streptococcus* spp., para *Mycoplasma* spp. No entanto os autores não descartam a possibilidade de que os dois gêneros tenham adquirido tal plasmídeo de formas independentes.

No ano seguinte, os pesquisadores Roberts e Kenny (1986) identificaram este mesmo plasmídeo *tetM* em isolados de *Ureaplasma* spp., resistentes à tetraciclina. Demonstraram, assim, que este determinante de resistência está bem representado na ordem *Mycoplasmatales* (ROBERTS; KENNY, 1986).

Atualmente, a detecção deste plasmídeo pode ser feita por PCR, apresentando excelente correlação com o método de difusão em ágar e com os MICs (concentrações inibitórias mínimas), realizada em meio líquido (BLANCHARD, 1992). Assim, a determinação de sua presença em amostras clínicas poderá contribuir no que se refere à definição do tratamento a ser empregado.

2 - Objetivos

2.1- Objetivo Geral

Esse trabalho teve como objetivo caracterizar através de técnicas de cultivo e moleculares as espécies: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* em material cervical de gestantes.

2.2 – Objetivos específicos

1. Isolar *Mycoplasma* spp., e espécies do gênero *Ureaplasma* spp., através do cultivo de material cervical de gestantes;
2. Identificar a espécie *Mycoplasma hominis* através da reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando *primers* genéricos e específicos;
3. Definir os isolados do gênero *Ureaplasma* spp., nas espécies: *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* através da análise da MBA por PCR;
4. Estudar a heterogeneidade da espécie *Mycoplasma hominis* das amostras puras e positivas através da reação de RAPD;
5. Determinar a presença do plasmídeo *tetM* nas amostras positivas para micoplasmas por meio da PCR.

3 – Materiais e Métodos

3.1- Amostragem

As amostras clínicas foram obtidas de mulheres grávidas de várias idades gestacionais atendidas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Todas as pacientes foram esclarecidas e concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento (Anexo 1). As amostras clínicas foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário onde foram realizados os cultivos. Após essa fase, os materiais clínicos foram encaminhados para o Laboratório de Micoplasmaologia da Disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo a fim de que fossem realizados os testes moleculares.

3.1.1- Material Clínico

As secreções cervicais de mulheres grávidas foram colhidas com o auxílio de swabs alginatados neutros, transportadas em meio de transporte A₃xb (SHEPARD, 1976, mod.) e mantidas sob refrigeração até o momento da sementeira. O esquema a seguir ilustra o fluxograma utilizado no processamento do material clínico.

3.2 – Cultivo de micoplasmas

3.2.1 – Meios de cultura

Na coleta, isolamento e identificação dos micoplasmas os meios de cultura foram preparados segundo Anexo 02.

Cada amostra foi transportada em 3ml de meio de transporte A_{3xb} (SHEPARD, 1976, mod.) dos quais foi utilizado aproximadamente 1mL para o cultivo. O restante foi conservado a -20 °C para a realização dos testes moleculares.

3.2.2- Semeadura

A semeadura foi realizada homogeneizando-se os tubos contendo as amostras clínicas em meio de transporte A_{3xb}. A partir da homogeneização uma alíquota de 0,1mL foi semeada em meio sólido A7 (SHEPARD, 1976, mod.), seguido da inoculação de 0,5 mL da amostra em tubos contendo 2mL de meio líquido arginina (VELLECA 1979, mod.) e de 0,5mL da amostra em 2mL de U₁₀ (SHEPARD, 1976, mod.).

Os tubos e placas semeados foram incubados a 36 ±1°C, em jarra de vela (2 a 3% de CO₂).

3.2.3 – Identificação

No meio sólido A7 foi possível observar a formação de colônias tanto de *Ureaplasma* spp., como de *Mycoplasma* spp. As colônias de *Mycoplasma* spp., apresentaram a forma característica de “ovo frito” enquanto que as colônias de *Ureaplasma* spp., foram distinguidas pelo tamanho extremamente diminuto e por uma coloração marrom-dourada.

No meio líquido de arginina as cepas de *Mycoplasma* spp., promovem a degradação da arginina caracterizada pela alteração da cor do meio de róseo para púrpura. No meio líquido U₁₀ cepas de *Ureaplasma* spp hidrolisam a uréia formando amônia alcalinizando o meio alterando a cor do meio de amarelo para púrpura devido sua alcalinização (TAYLOR-ROBINSON, 1996b).

Figura 01: Colônias de *Mycoplasma hominis* em meio sólido A7.

Figura 02: Fotos de colônias de *Ureaplasma* spp em meio sólido A7

Figura 03: Colônias de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp isoladas em meio A7.

3.3 - IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS ATRAVÉS DA TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - PCR

Para a realização de PCR foram utilizados os seguintes reagentes, materiais e equipamentos:

3.3. 1 - Reagentes

3.3.1a - Para a extração:

- EDTA (Reagen), Tris base (USB), HCl (Merk), Triton-X (SERVA, Feinbiochemical GmbH & Co. Germany), Proteinase K (SIGMA, Chemical Company), Fenol tamponado com Tris (Invitrogen), cloroformio (Merk), álcool isoamílico (Merk), acetato de sódio (Merk), ácido bórico e etanol absoluto.

3.3.1b - Para a reação de amplificação:

- Taq DNA polimerase (Invitrogen), Tampão 10X concentrado (Invitrogen), Cloreto de magnésio (Invitrogen), bases nitrogenadas (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (GIBCO-Life Technologies, Bethesda Research Laboratories), primers correspondentes (Invitrogen).

3.3.1c - Gel de eletroforese

- Agarose, tampão TE, brometo de etídio, padrão de peso molecular 100bpDNA Ladder (GIBCO- Life Technology), ϕ X174 DNA/Hae III fragments (Amershan pharmacia biotech), Gel Loading Solution (SIGMA- Aldrich , Chemical Co., St. Louis, MO, EUA)

3.4 – Materiais para realização da PCR

- Tubos de microcentrífuga do tipo Eppendorf de volumes: 0,2; 0,5; 1,7; 2,0 mL (Axygen Scientific)
- Ponteiras de 0,5 a 10 μ L; 10 a 200 μ L e 100 a 1000 μ L (Uniscience do Brasil, São Paulo, Brasil).

3.5 – Equipamentos para realização da PCR

- Micropipetas (Gilson, Emeryville, CA, EUA)
- Termociclador (Applied Biosystems - Perkin Elmer, modelo Gene Amp PCR System 2400 Norwalk, CT, USA);
- Fonte de energia para eletroforese (AUJE Ind. Eletro Eletrônica LTDA São Paulo - Brasil);
- Agitador de tubos modelo 251 (FANEN, São Paulo, Brasil);
- Microcentrífuga modelo MICROMAX RF (Internacional Equipament Company, Needham Heights, MA, USA);
- Transiluminador modelo MacroVue UV-20 e câmara fotográfica modelo Polaroid Gel Cam (Hoefer's The United Kingdom)

3.6 - Processamento das amostras para realização da PCR

3.6.1 - Extração do DNA micoplásmico

Para extrair o DNA dos micoplasmas para a realização da PCR, aproximadamente 1mL das amostras clínicas colhidas em meio de transporte A_{3xb} foram centrifugadas a 10.000xg por 30 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram tratados com 0,5mL do tampão de lise (EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, Triton X-100 1%, Proteinase K 200µg/mL, pH 8.0) seguidos de incubação a 56°C por 60 minutos, e de fervura por 10 minutos para inativar a proteinase K. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de fenol tamponado com Tris, submetendo-se essa mistura à emulsificação em agitador vortex, com posterior centrifugação a 5.000 g por 5 minutos para a remoção das proteínas. As fases orgânicas foram desprezadas e foram adicionados 0,5mL da mistura fenol, clorofórmio e álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, também com o objetivo de eliminação dos resíduos de proteína. Novamente as misturas foram emulsificadas e centrifugadas como realizado anteriormente, sendo as fases aquosas transferidas para um novo tubo de microcentrifugação onde foram adicionados 1,0 mL de etanol absoluto e 50µL de acetato de sódio 3M. Após homogeneização, as amostras foram mantidas a -20°C por um período mínimo de 1 hora para a precipitação do DNA. A seguir, as mostras foram centrifugadas a 10.000xg e os sedimentos lavados com 1,0 mL de etanol a 70%. Os sobrenadantes foram desprezados e os tubos permaneceram a temperatura ambiente até a completa evaporação do álcool remanescente. Os DNAs foram ressuspensos com 100µL de tampão TE (EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, pH 8.0) (BARBEYRAC, 1996).

3.6.2 - Protocolo básico empregado na realização de PCR multiplex utilizando *primers* genéricos para identificação de micoplasmas e *primers* para identificação do DNA plasmidial pBr₃₂₂

Foi realizada a reação adicionando-se: 5µL de tampão Taq 10X concentrado (Invitrogen), 1,5µL de MgCl₂, 0,4µL de dNTP (solução de nucleotídeos, GIBCO BRL, Gaittthersburg, MD USA), 1µL de cada um dos pares de *primers* MGSO e GPO1, 1 U (0,2 µL) de Taq DNA polimerase, água pura grau reagente I (Milli-Q) qsp 40µL e à essa mistura foram adicionados 10µL do DNA micoplasmal extraído. A reação teve volume final de 50µL seguindo a padronização de VAN KUPPEVELD (1992).

O protocolo de amplificação do DNA foi o seguinte: desnaturação inicial de 15 minutos a 95°C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C; 1 minuto e 30 segundos a 58°C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C. Ao final ocorreu um extensão de 10 minutos a 72°C e as amostras foram conservadas a 4°C. Esse processo de amplificação foi realizado no equipamento termociclador automático Gene Amp2400.

As amostras amplificadas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X concentrado e reveladas com brometo de etídio. A impregnação com brometo de etídio foi realizada deixando-se o gel submerso em uma solução de brometo de etídio a 0,5% por 15 minutos, seguido por imersão em água destilada por 5 minutos para retirada do excesso de brometo de etídio.

3.6.2a - DNA micoplásmico

Foram utilizados na reação dez microlitros dos DNAs extraídos das amostras positivas nas culturas. Todos os DNAs extraídos de todas as amostras foram inicialmente testados frente aos *primers* genéricos MGSO e GPO1 (Invitrogen), em uma concentração de 40µM (DUSSURGET et al., 1994). Estes *primers* permitem a amplificação de um fragmento de 717 bp da região que codifica a porção 16S do rRNA (DUSSURGET et al., 1994).

Seqüências do par de *primers*:

Primer sense: 5' – TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC – 3'

Primer anti-sense: 5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC CGT A – 3'

3.6.2b - DNA plasmidial pBr₃₂₂

Como controle interno da reação utilizou-se o DNA pBr₃₂₂ (SIGMA CHEM. Co., St. LOUIS, MO, USA), adicionando-se 2 fg deste em todas amostras testadas e o par de *primer* correspondente na concentração de 40µM. Amplificou-se um fragmento de 965 bp. (Anexo 3) (ABIVEN, 1992).

Seqüência do par de *primers*:

Primer sense: 5'- CAT CTC GGG CAG CGT TGG GT – 3'

Primer anti-sense: 5'- AGC GAC GCG AGT CAG TGA GC – 3'

3.7 – Reação da polimerase em cadeia para a detecção de espécies de micoplasmas

As amostras positivas na PCR multiplex foram submetidas à nova PCR com pares de *primers* específicos da espécie *Mycoplasma hominis* para a identificação de cada isolado. Da mesma forma para identificação dos isolados de *Ureaplasma* spp., foi empregado um protocolo baseado na análise da MBA permitindo separar as duas espécies: *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*.

3.7.1 - PCR específico para *Mycoplasma hominis*

A reação foi realizada utilizando 10µL do DNA extraído puro e diluído 1:10 em água ultra pura estéril. A reação teve como volume final 50µL e para a identificação

e especificidade foram utilizados dois pares de *primers* que codificam a região 16S do rRNA, como mostram as Tabelas I e II.

O protocolo de amplificação foi o seguinte: inicialmente 15 minutos a 95°C para ocorrer a desnaturação do DNA, seguida por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C; 1 minuto e 30 segundos a 58°C; 1 minuto e 30 segundos a 72°C, e finalmente uma extensão de 10 minutos a 72°C. Após amplificadas, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%.

Tabela I: Descrição das seqüências dos pares de *primers* utilizados na realização da PCR específica para identificação de *Mycoplasma hominis*

Micoplasma	Par de <i>primers</i>	Seqüência 5'- 3'
<i>M. hominis primer 1</i>	HOM 1	TGA AAG GCG CTG TAA GGC GC
	UNI	TAA TCC TGT TTG CTC CCC AC
<i>M. hominis primer 2</i>	RNA H1	CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C
	RNA H2	GGT ACC GTC AGT CTG CAA T

Tabela II: Concentração dos pares de *primers* empregados na PCR específica para identificação de *M. hominis*, respectivos produtos de amplificação e referências bibliográficas

	Concentração dos <i>primers</i> (µM)	Produto amplificado (bp)	Referência bibliográfica
<i>M. hominis</i> (<i>primer 1</i>)	40	589	DUSSERGET et al., 1994
<i>M. hominis</i> (<i>primer 2</i>)	40	334	BLANCHARD et al., 1993

3.7.1a - ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DAS REGIÕES AMPLIFICADAS ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO

A análise da especificidade do produto amplificado foi realizada submetendo o produto amplificado de todas as amostras positivas à ação da enzima de restrição específica (*Hind III*).

No estudo, o produto amplificado pelo par de *primers* 2 (334 bp), foi o escolhido para a confirmação da especificidade. A enzima utilizada foi a *Hind III* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) e o produto digerido foi observado pela formação de dois fragmentos um de 228 bp e outro de 106 bp.

A reação foi realizada com um volume final de 20µL onde 10µL foram do produto amplificado, pelo par de *primer* 2, acrescido de 2µL do tampão de reação 10X REACT2® concentrado, 1U da enzima *Hind III* e água estéril ultra pura qsp para 20µL. Após a incubação a 56°C por uma hora o produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio. A visualização do produto digerido foi realizada em luz UV.

3.7.2 - Reação de PCR específica para o gênero *Ureaplasma*

A detecção de *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* para as amostras com crescimento de colônias suspeitas foi realizado segundo KONG et al., 1999 e 2000. Esse protocolo de PCR amplifica as Múltiplas Bandas Antigênicas (MBA). O par de *primers* utilizado para a biotipagem do gênero *Ureaplasma* foi UMS 125 / UMA 226.

Seqüência do par de *primers*

UMS 125: 5'- GTA TTT GCA ATC TTT ATA TGT TTT CG – 3'

UMA 226: 5'- CAG CTG ATG TAA GTG CAG CAT TAA ATT C – 3'

A amplificação do DNA ocorreu da seguinte forma: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos seguidos de 40 ciclo: de 95°C por 30 segundos, a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto .

Tabela III: Descrição do par de “primers” utilizado para biotipagem do gênero *Ureaplasma*; tamanho dos fragmentos e referência bibliográfica

Par de primers		Tamanho dos fragmentos (bp)	Referência Bibliográfica
<i>Ureaplasma</i> spp	UMS 125 5'- GTATTGCAATCTTTATATGTTTTTCG-3'	448 e 403/404	KONG et al., 1999
	UMA 226 5'- CAGCTGATGTAAGTGCAGCATTAAATTC-3'		

A biotipagem do gênero *Ureaplasma* foi realizada utilizando os primers UMS125/UMA 226 que amplificam fragmentos de 403/404 e 448 respectivamente caracterizando as espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*.

3.7.3 - Detecção do plasmídeo *tet M*

A reação de PCR para a determinação do plasmídeo de resistência foi realizada em algumas amostras com culturas positivas para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* spp. A presença do plasmídeo *tetM* foi determinada a partir da obtenção de um fragmento de 397 bp após amplificação com o par de *primers* abaixo seguindo-se o protocolo de amplificação com volume total de 50µl o qual foi submetido a 40 ciclos de denaturação a 95°C por 25 segundos, anelamento dos *primers* a 50°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.

A especificidade foi determinada através da enzima de restrição *Taq I* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA). A partir de alíquotas de 20µl do produto amplificado, a digestão foi realizada utilizando-se 1U da enzima de restrição *Taq I*, 5µl do tampão One Phor All buffer 10X concentrado. (BLANCHARD et al., 1992)

Os produtos dessa digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e observados por meio de luz UV. O marcador de peso molecular utilizado foi 100bp (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA).

Par de primers utilizados para detecção do plasmídeo *tetM*

Primer sense: 5'- TTA TCA ACG GTT TAT CAG C – 3'

Primer anti-sense: 5'- CGT ATA TAT GCA AGC G – 3'

3.7.4 - REAÇÃO DE RAPD (Random Amplification of Polimorphic DNA)

Com o objetivo de investigar se as cepas *Mycoplasma hominis* isoladas das amostras clínicas apresentavam a heterogeneidade intra-espécie, relatada na literatura (SOROKA et al., 2001), foi realizada a reação de RAPD.

Na PCR clássica utiliza-se dois *primers* muito bem definidos (*sense* e *anti-sense*) para amplificar um segmento conhecido do DNA e a especificidade da amplificação é verificada pelo tamanho dos produtos amplificados (pares de base ou bp). A reação de RAPD, por outro lado, envolve a escolha de um *primer* arbitrário que não possui uma sequência de nucleotídeos previamente conhecida no DNA alvo. A reação de RAPD produz um resultado semelhante a um código de barras resultante do anelamento arbitrário do *primer* em seqüências selecionadas e amplificadas de algumas regiões.

Figura 04: Exemplo de uma representação esquemática de reação de RAPD onde um único *primer* se liga a várias regiões diferentes do DNA, gerando dois produtos após a amplificação (A e B)

Figura 05: Exemplo de uma representação esquemática de reação de RAPD onde um único *primer* se liga em várias regiões diferentes do DNA, gerando, após a amplificação, um produto (B).

Figura 06: Exemplo de eletroforese realizada com os dois produtos amplificados (exemplos das figuras 1 e 2) demonstrando como a reação de RAPD evidencia diferenças entre membros da mesma espécie.

A reação de RAPD (Amershan Pharmacia) foi realizada com amostras positivas e puras para *Mycoplasma hominis*.

Para que os resultados de RAPD sejam confiáveis são necessárias duas condições básicas: 1) que as amostras sejam puras pois, em se tratando da utilização

de *primers* genéricos, estes irão se anelar em qualquer DNA presente na amostra; 2) que as quantidades de DNA sejam as mesmas para todas as amostras.

A quantificação da concentração de DNA das amostras foi realizada por espectrometria e as amostras foram diluídas para mesma concentração e dentro dos parâmetros solicitados pelo fabricante do kit (5 a 50 ng de DNA extraído).

A escolha do *primer* utilizado foi baseada na literatura (SOROKA et al., 2001) e na concentração C+G da espécie *Mycoplasma hominis* a qual se situa entre 33 a 37%.

Como, durante nosso estudo, foram inúmeros os casos detectados de co-infecção de *M. hominis* e *Ureaplasma* spp., e pela dificuldade em se isolar essas espécies devido ao tamanho diminuto de suas colônias, foi realizada uma reação de PCR para o gênero *Ureaplasma* de todas as amostras positivas para *M. hominis* a fim de garantir a pureza do DNA e ser possível a realização da reação de RAPD.

A reação ocorreu em um volume final de 25µL, sendo utilizados 5µL do DNA extraído, 5µL do *primer* e 15µL de água ultra pura. A amplificação foi realizada no equipamento termociclador cujo protocolo foi o seguinte: 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 95°C por um minuto, 36°C por um minuto, 72°C por dois minutos e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Após a amplificação as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%, coradas com brometo de etídio.

O kit compõem-se de 6 *primers* diferentes, os quais foram testados individualmente para que fosse avaliado qual deles apresentaria uma maior eficiência de resultados.

Os *primers* que fazem parte do kit são:

Primer 1- 5'- GGTGGCGGAA -3'

Primer 2 - 5'- GTTTCGCTCC -3'

***Primer 3* - 5'- GTAGACCCGT- 3'**

Primer 4- 5' - AAGAGCCCGT-3'

Primer 5- 5'- AACGCGCAAC- 3'

Primer 6- 5'- CCCGTCAGCA- 3'

O *primer* que apresentou melhor resultado foi o *primer 3*, tendo sido, portanto, o de nossa escolha.

4 - RESULTADOS

4.1 - Resultados das culturas de micoplasmas

Os resultados observados das culturas em meios sólidos e nos meios líquidos das amostras clínicas resultou em 69,3% (113/163) de amostras positivas para micoplasmas. Destas 21,2% (24/113) foram positivas para *Mycoplasma hominis*, enquanto 78,8% (89/113) foram positivas para *Ureaplasma* spp. Tendo sido ainda observadas 15% de co-infecções.

Figura 07: Gráfico dos resultados obtidos a partir dos cultivos de 163 amostras cervicais de gestantes.

Figura 08: Distribuição das 113 amostras obtidas isoladas de material cervical de gestantes de acordo com as espécies: *Ureaplasma* spp., *M. hominis* e coinfeção: *M. hominis* e *Ureaplasma* spp.

4.2 – PCR multiplex para a detecção de *Mycoplasma hominis*

A identificação de *M. hominis* foi realizada através da PCR multiplex realizada com dois pares de *primers* específicos para *M. hominis* e dois pares de *primers* para amplificar o DNA plasmidial pBr₃₂₂ (controle interno)

Figura 09: Resultado da PCR multiplex para identificação de *M. hominis*. Nesta reação foi utilizado como controle interno um par de *primers* para detecção do DNA plasmidial pBr₃₂₂ que tem como produto de amplificação um fragmento de 956bp; dois pares de *primers* específicos para *M. hominis* resultando em dois produtos de amplificação sendo: um fragmento de 589 bp e outro de 334 bp. 1) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2 e 3) controles negativo e positivo respectivamente; 4 a 14) amostras positivas para *M. hominis*.

As amostras positivas na reação multiplex foram amplificadas somente com o par de *primers* 2 (fragmento 334 bp). Esse produto amplificado foi digerido com a enzima de restrição *Hind III*, determinando assim a especificidade dos *primers* utilizados, obtendo-se como resultado da ação da enzima fragmentos de 228 e 106 bp, confirmando a presença de *Mycoplasma hominis* na amostra.

Figura 10: PCR utilizando-se o par de *primers* 2 o qual originou como produto de amplificação um fragmento de 334 bp; 1 e 13) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2) controle positivo; 3 a 11) amostras positivas ;12) amostra negativa

Figura 11: Resultado da PCR onde o DNA amplificado pelo par de *primer* 2 originou em um fragmento de 334 bp o qual foi submetido à digestão pela enzima *Hind III*, resultando em dois fragmentos: 269bp e 141 bp. 1) marcador de peso molecular 174 bp; 2 e 3) controles positivos ; 4, 6 e 8) amostras positivas antes da digestão enzimática; 5, 7 e 9) amostras positivas após a digestão.enzimática

4.3 - PCR específica para a identificação das espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*

Todas as culturas positivas para *Ureaplasma* spp., foram amplificadas com os *primers* UMS 125 e UMA 226, a fim de caracterizar as espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*.

Figura 12: PCR empregado na detecção das espécies *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* com os *primers* UMS 125 e UMA 226; 1) marcador de peso molecular $\times$ 174bp; 2) controle positivo: *U. parvum*: fragmento 403-404 bp; 3) controle positivo *U. urealyticum*: fragmento de 448bp; 4 a 15) resultados observados com as amostras clínicas

Dentre os resultados obtidos foi observado que 54,6% (89/163) das amostras foram positivas para *Ureaplasma* spp., e destas 68,5% (61/89) foram identificadas como sendo *Ureaplasma parvum*, e 31,5 % (28/89) foram identificadas como sendo *Ureaplasma urealyticum*.

Tabela IV : Resultado da biotipagem das amostras positivas para *Ureaplasma* spp., através da PCR

Biotipagem	Número de casos	% Casos
<i>Ureaplasma</i> spp	89/163	54,6
<i>Ureaplasma parvum</i>	61/89	68,5
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	28/89	31,5

Figura 13: Gráfico acima representando a sequência de distribuição das espécies *U. parvum* e *U. urealyticum* isoladas das amostras clínicas e identificadas pela análise de MBA.

4.4 – Resultados da reação de RAPD para caracterização intra-espécie de *Mycoplasma hominis*

A partir das amostras puras para *M. hominis*, excluídas portanto as co-infecções com as espécies do gênero *Ureaplasma*, foi realizada a prova de RAPD em 7 das 24 amostras positivas para *M. hominis* (29,2%).

A figura 14 mostra os perfis eletroforéticos dos produtos randomicamente amplificados. Pode-se observar perfis extremamente semelhantes entre as cepas 3 e 4, e que diferiram das demais cepas. Nas amostras 6 e 8 também foi observado similaridade nos perfis e heterogeneidade quando comparada com as demais cepas. Assim podemos observar que de sete cepas analisadas obtivemos 5 perfis eletroforéticos distintos após a amplificação por PCR.

Portanto, após a análise concluímos que as cepas 3 e 4 são similares entre si e da mesma forma 6 e 8 apresentam o mesmo perfil gênico.

Figura 14: Resultado da reação de RAPD nas cepas estudadas. 1) marcador de peso molecular de 100bp DNA Ladder; 2 a 8) cepas de para *M. hominis*.

Tabela V: Relação das cepas de *M. hominis* analisadas e número de fragmentos observados após realização da reação de RAPD

Cepas	Quantidade de fragmentos gerados após o RAPD
2	12 bandas
3	8 bandas
4	8 bandas
5	7 bandas
6	14 bandas
7	7 bandas
8	14 bandas

4.5 – PCR específico para detecção do plasmídeo *tetM* em amostras positivas de *Ureaplasma* spp., e de *Mycoplasma hominis*

A presença do plasmídeo de resistência foi testada em algumas amostras positivas para *Ureaplasma* spp., e *Mycoplasma hominis*. A presença do plasmídeo pode ser comprovada pela presença de um produto amplificação de 397bp. Os resultados encontrados foram os seguintes: 57,1% (4/7) das amostras positivas e puras de *Mycoplasma hominis* apresentaram o plasmídeo *tetM*. Das 72 amostras de *Ureaplasma* spp., 40,2% (29/72) apresentaram o plasmídeo de resistência. No que se refere aos resultados observados em cada espécie obtivemos: *Ureaplasma urealyticum* apresentou 33,4% (4/12) de resistência e *Ureaplasma parvum* 41,6% (25/60). Nas co-infecções não foi realizada a pesquisa do plasmídeo *tetM* por não ser possível a avaliação da resistência de cada espécie individualmente.

Figura 15: PCR específica empregada para detecção do plasmídeo *tetM* resultando em fragmento de 397 bp 1) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2) controle positivo: *U. parvum* resistente a tetraciclina; 3) controle negativo; 4, 6, 7 e 8) amostras positivas demonstrando a presença do plasmídeo "*tetM*"; 5) amostra negativa

Figura 16: PCR específica utilizada na detecção do plasmídeo *tetM* em amostras de *Ureaplasma* spp., com amplificação do produto de 397bp 1) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2) controle negativo; 3) controle positivo: cepa de *Ureaplasma parvum* resistente a tetraciclina; 4 e 7) amostras positivas para o plasmídeo *tetM*, 5, 6 e 8) amostras negativas para o plasmídeo *tetM*.

Figura 17: PCR realizada para detecção do plasmídeo “ *tetM* ” com posterior digestão utilizando-se a enzima de restrição *Taq I*. O tamanho dos produtos de digestão amplificados foram: 190bp, 130bp e 77bp. 1) marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder; 2) controle positivo sem tratamento; 3) controle positivo após o tratamento com *Taq I*; 4) amostra positiva antes do tratamento; 5) amostra positiva após o tratamento com *Taq I*

Tabela VI –Resultado da PCR para pesquisa do plasmídeo *tetM*.

Espécie	Cepas resistentes
<i>Mycoplasma hominis</i>	57,1%
<i>Ureaplasma parvum</i>	41,6%
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	33,4%

Figura 18: Gráfico representando a porcentagem de cepas de *M. hominis*, *U. parvum* e *U. urealyticum* que apresentaram o plasmídeo *tetM*.

Discussão

5 - Discussão

O presente estudo teve como objetivos determinar a frequência das espécies de micoplasmas mais isoladas no trato geniturinário de gestantes: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, por cultura com posterior identificação por PCR, análise da heterogeneidade intra-gênica das cepas puras de *Mycoplasma hominis* por RAPD e estudo da resistência à tetraciclina por métodos moleculares.

A utilização da PCR e do cultivo para o estudo dos micoplasmas baseou-se em publicações consagradas na literatura. O emprego da reação de RAPD para o estudo de *Mycoplasma hominis* é inédito no Brasil, cuja escolha visou contribuir com mais subsídios para o conhecimento dos perfis gênicos da espécie.

Apesar da padronização de um método de identificação e subtipagem das espécies *Ureaplasma parvum* e *U. urealyticum* por PCR estar descrita na literatura tanto por métodos sorológicos como por biologia molecular, muitos autores ainda referenciam estas espécies como *Ureaplasma urealyticum* biotipo 1 (biotipo parvo) e biotipo 2, respectivamente (MITSUNARI et al., 2005). Outros autores sequer relatam a existência de duas espécies humanas de *Ureaplasma* spp., (DOMINGUES et al., 2003 ; GERBER et al., 2003) o que dificulta uma análise acurada dos resultados.

Em recente estudo realizado por Kong e Gilbert (2004), os autores investigaram as diferenças genômicas entre as espécies *U. parvum* e *U. urealyticum* e concluíram que existem diferenças significantes quanto ao tamanho dos genes ou *clusters* das duas espécies, e que a diferença é maior que 80 Kbp. Desta forma, não há mais dúvida quanto a heterogeneidade entre estes dois microrganismos sendo necessária a realização de estudos mais detalhados para atribuição da real patogenicidade de cada uma destas espécies nas doenças humanas.

No que se refere às frequências com que as espécies do gênero *Ureaplasma* foram detectadas em nosso estudo, estas estão assim distribuídas. De um total de 163

amostras cervicais cultivadas, 68,3% (113/163) foram positivas para micoplasmas sendo 54,6% (89/163) para *Ureaplasma* spp. Dentre as amostras positivas para o gênero *Ureaplasma* spp., 68,5% (61/89) foram identificadas como sendo ***Ureaplasma parvum*** e 31,5% (28/89) como sendo ***Ureaplasma urealyticum***.

Nossos resultados demonstraram semelhança aos observados na literatura quanto à frequência de isolamento de ureaplasmas e a predominância da espécie *Ureaplasma parvum*.

Povlsen et al. (2001), em estudo realizado com 484 amostras de gestantes obtiveram 57,9% de amostras positivas para o gênero *Ureaplasma* spp. Quanto às espécies detectadas, os autores tiveram uma franca predominância da espécie *U. parvum* em 90% das amostras estudadas, enquanto que *U. urealyticum* que foi observado em 7% das amostras. Nossos resultados são bastante semelhantes aos observados pelos autores, quanto a frequência de isolamento de ureaplasmas e a predominância da espécie *Ureaplasma parvum*.

Em outro estudo Abele-Horn et al. (1997), obtiveram 70% de amostras positivas para o gênero *Ureaplasma* spp., destas 85,1% (148/174) foram positivas para *U. parvum* e 14,9% (26/174) para *U. urealyticum*. Os autores também observaram 4,6% (8/174) casos de associações de ambos os biotipos.

Em estudos recentes realizado Mitsunari et al. (2005), *Ureaplasma* spp., foi detectado em 57,3% (47/82) das amostras cervicais de gestantes. Estes resultados mostraram estreita concordância com os observados em nosso trabalho onde *Ureaplasma* spp., foi isolado em 54,6% das amostras. No que se refere à detecção das espécies de ureaplasmas os autores obteve de um total de amostras analisadas, 52,4 % (43/82) e 7,3% (6/82) de positividade para *U. parvum* e *U. urealyticum* respectivamente, enquanto que na nossa amostragem obtivemos no quadro total de amostras 37,4% (61/163) de *U. parvum* e 17,2% (28/163) de *U. urealyticum*.

A adequação das metodologias aqui empregadas, que são acessíveis aos laboratórios tanto de pesquisa como de diagnóstico, permitem visualizar o seu uso para

fins de estudos epidemiológicos e de diagnóstico, com resultados mais precisos e mais eficientes para cada agente.

O empenho em se caracterizar cada cepa isolada de ureaplasma tem como justificativa a tentativa de uma possível associação de determinados sorotipos à diferentes patologias humanas (ROBERTSON, 1993; PITCHER, 2001)

Há anos os pesquisadores tentam associar um sorotipo particular a uma doença. Naessens et al. (1988), associaram a prevalência da espécie *U. urealyticum* sorotipo 4 à mulheres com história de abortos recorrentes (PITCHER et al, 2001). Paradoxalmente, Chaim et al. (2003), investigaram o envolvimento de *Ureaplasma* spp., em casos de endometrite pós-parto e concluíram que *U. parvum* foi a espécie envolvida e mais freqüentemente isolada tanto no grupo de mulheres que desenvolveram a endometrite como no grupo de mulheres que não a desenvolveram. Essa variação foi atribuída também à diferenças de concentração de ureaplasmas presentes nas amostras e não apenas à sua presença. Nelson et al, (1998), em um estudo de detecção de *Ureaplasma* spp., em aspirado endotraqueal de recém nascidos, concluíram que os sorotipos mais freqüentes nesse material foram os sorotipos 3 e 14 (co-infecção) e que a espécie *U. parvum* foi a predominante. Apesar desses achados não houve evidências contundentes associando um único sorotipo com a doença pulmonar crônica, uma vez que o autor se deparou com vários casos de co-infecção. Contudo a predominância da espécie *U. parvum* faz com que se associe mais uma vez a espécie com estados patológicos.

Kong et al. (1999), propuseram a tipagem dos diferentes sorotipos das espécies *U. parvum* como de *U. urealyticum*, por técnica de biologia molecular, usando uma combinação de diferentes pares de *primers*, em diferentes etapas e uso de enzimas de restrição. Apesar da eficiência deste método, que já foi comprovada anteriormente por nosso grupo (GODRY, 2001), este é trabalhoso (PITCHER et al, 2001). É evidente a necessidade do desenvolvimento de um método fácil e rápido de

caracterização das espécies de ureaplasmas para que se possa melhor conhecer o seu verdadeiro papel patogênico na etiologia das doenças humanas.

Da mesma forma que as espécies humanas de ureaplasmas apresentam **heterogeneidade**, o mesmo tem sido observado com a espécie *Mycoplasma hominis*. Tal heterogeneidade talvez justifique uma diversidade de papel patogênico nas doenças humanas.

Em nosso estudo 21,2% (24/113) das mulheres colonizadas por micoplasmas foram positivas para *Mycoplasma hominis*, sendo esses dados semelhantes ao encontrados por Domingues et al.(2003); Ofendaal et al., 2002, porém é inferior ao citado por Blanchard et al. (1993), onde relatam colonizações acima de 40%.

Apesar de ser um patógeno humano que pode ser sexualmente transmitido, a espécie *Mycoplasma hominis* também é freqüentemente encontrada colonizando o trato geniturinário. Apesar de anos de estudos sobre a associação deste micoplasma a um certo número de doenças, o papel desta bactéria ainda não está claro. Os relatos de infecções extragenitais em pacientes imunossuprimidos têm aumentado fazendo com que a avaliação do potencial patogênico da espécie *M. hominis* seja ainda foco de discussão pelo fato deste microrganismo ser isolado freqüentemente de homens e mulheres assintomáticas (JENSEN et al, 1998). Esta ambigüidade pode ser devido a inúmeros fatores, muitos dos quais desconhecidos. O alto grau de heterogeneidade genômica e antigênica da espécie, demonstrada através de estudos sorológicos, hibridização de ácidos nucleicos, comparação de padrão protéico e análise do perfil após tratamento com enzima de restrição, seja uma das razões (LADEFOGED; CHRISTIANSEN, 1992)

Dados da literatura revelam que a participação da espécie *Mycoplasma hominis* na vaginose bacteriana (VB) não está definida. Em estudo realizado por Ayra et al. (2001), contrariamente a outros autores, concluíram que a presença de *M. hominis* não altera a secreção vaginal e não exerce influência quanto ao aparecimento de polimorfonucleares. Tais observações descaracterizariam *M. hominis* como causa da

vaginose bacteriana. Donders et al. (1998), observaram que 48% das mulheres que tiveram aborto espontâneo estavam colonizadas com *M. hominis* enquanto que somente 8,2% das mulheres do grupo controle apresentavam a infecção. Odendaal et al. (2002), pesquisando a participação de *M. hominis* em partos prematuros concluíram que esta espécie está mais associada a nascimentos prematuros que *C. trachomatis* e espécies do gênero *Ureaplasma* spp.

A heterogeneidade da espécie se manifesta por substituições pontuais de nucleotídeos e aminoácidos e mutações no genoma resultando em uma variação no tamanho do mesmo. Vários métodos podem ser utilizados para demonstrar esta heterogeneidade em isolados clínicos de *M. hominis*: análise de restrição, RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), PFGE (pulsed-field eletrophoresis) e inserção de sequência típica. Todas essas análises necessitam de material biológico abundante, de tempo e são de difícil interpretação (SOROKA et al, 2001) .

O estudo por nós desenvolvido teve como principal objetivo demonstrar a variação intra-gênica da espécie *Mycoplasma hominis* através de uma técnica mais rápida e fácil de interpretar “Random Amplification Polymorphic DNA” (RAPD). Na literatura nacional e internacional existe apenas um relato da utilização desta técnica para o estudo da heterogeneidade das cepas de *M. hominis*, isoladas de materiais biológicos. Em contraste a esse fato a literatura nacional e internacional é muito rica em publicações se referindo à técnica de RAPD para diferentes bactérias com diferentes objetivos.

No que se refere a utilização da técnica de RAPD para análise de micoplasmas, a literatura apresenta raras publicações sendo uma delas a de Knox e Timm (1998), os quais compararam diversas técnicas de tipagem de cepas de *Ureaplasma* spp., por biologia molecular, dentre elas RAPD, com objetivo de determinar se, dentre as cepas isoladas de mulheres grávidas, haveria alguma que fosse predominante em casos de alterações gestacionais. O referido estudo concluiu que muitas vezes o subtipo detectado no trato genital inferior não corresponde ao mesmo subtipo encontrado no trato genital superior e assim sendo, a análise da colonização da região cervical de mulheres grávidas não é preditivo de efeitos adversos na gravidez.

Em nosso estudo 24 amostras foram positivas para *Mycoplasma hominis*. Sete amostras, cuja pureza foi determinada através da PCR, foram submetidas a reação de RAPD. Os resultados observados demonstram a presença de cinco perfis genômicos diferentes. As amostras 3 e 4 apresentaram perfis semelhantes entre si, da mesma forma as amostras 6 e 8 também foram semelhantes. As amostras 2, 5 e 7 apresentaram perfis peculiares e próprios não similares a nenhum outro.

Estes resultados diferem, não de maneira significativa, da única referencia bibliográfica encontrada na literatura. Os autores Soroka et al. (2001), estudaram o perfil gênico por RAPD de nove cepas de *M. hominis* obtendo, como resultado, similaridade gênica em apenas duas. Uma das prováveis explicações para essa diferença pode residir nos *primers* escolhidos. Em nosso estudo, dentre um painel de seis *primers* o que melhor resultado apresentou possuía alta concentração C+G, enquanto que o escolhido por SOROKA e colaboradores (2001), dentre um painel de 14 *primers*, o *primer* escolhido era rico em A+T. Vale a pena observar que embora o genoma micoplásmico possua baixo teores de C+G, a sua distribuição não é homogênea. Enquanto as regiões intra-gêncas são ricas em conteúdo A+T e baixo em C+G, as regiões decodificadoras possuem concentrações mais elevadas de C+G. *M. pneumoniae* é um exemplo pois os genes que decodificam a adesina P1 e ORF6, exibem uma concentração C+G de 56mol% enquanto que, em outras regiões, a concentração C+G chega a 26mol%.

Esse fato sugere que as regiões mais conservadas do genoma, apresentem uma maior concentração C+G, o que talvez venha explicar a maior homologia entre as cepas por nós estudadas (RAZIN, 1998).

Outros pesquisadores também confirmaram a relativa homogeneidade de cepas de *M. hominis* isoladas de mulheres colonizadas e mulheres com infecções urogenitais. Os autores perceberam que havia uma certa similaridade antigênica entre as cepas isoladas de pacientes com vaginose bacteriana, ruptura prematura de membrana, parto prematuro e endometrite e que este grupo era heterogêneo quando comparado com os isoladas de mulheres assintomáticas (BUSCH et al, 1999).

Desta forma os resultados por nós observados denotam uma **heterogeneidade intra-espécie de *Mycoplasma hominis***, e que a utilização da

reação de RAPD poderá ser empregada como um marcador bacteriano na diferenciação de cepas isoladas de diferentes materiais clínicos e de diferentes pacientes.

O tratamento das infecções micoplásmicas tem sido preconizado por vários autores. Apesar destes microrganismos não serem sensíveis à penicilina e a outros antibióticos que atuam sobre a parede celular, apresentam suscetibilidade à uma variedade de outros antibióticos de largo espectro, sendo a maioria é bacteriostático. As tetraciclina têm se constituído no antibiótico de eleição, particularmente para o tratamento das infecções genitais. Os perfis de suscetibilidade antibiótica de vários micoplasmas de origem humana demonstram que, exceto para as penicilinas, os micoplasmas são intrinsecamente resistentes a um outro antibiótico: a rifampicina. Por outro lado alguns podem desenvolver resistência por mutação gênica ou por aquisição de um gene de resistência aos antibióticos, aos quais são normalmente sensíveis. A resistência dos micoplasmas à **tetraciclina** é comum e decorrente da aquisição do gene **tetM**.

Em nosso estudo a pesquisa do plasmídeo *tetM* teve como finalidade avaliar a frequência com que as cepas de micoplasmas isoladas apresentavam resistência à tetraciclina. Os resultados por nós obtidos demonstraram que 57,1% (4/7) das amostras puras para *Mycoplasma hominis* apresentaram o plasmídeo *tetM*, enquanto que nas amostras puras das espécies do gênero *Ureaplasma* spp., esse plasmídeo foi encontrado em 40,2% (29/72), das amostras. A análise da presença do plasmídeo, nas espécies *U. parvum* e *U. urealyticum*, apresentou os seguintes resultados: 41,6% (25/72) e 33,4% (4/12), respectivamente. Estes achados diferem dos encontrados por Abele-Horn et al. (1997), pois estes autores encontraram uma resistência maior na espécie *U. urealyticum*.

Estudos envolvendo um número maior de amostras devem ser realizados devido a alta frequência da presença do plasmídeo *tetM*, principalmente para a espécie *M. hominis* na nossa amostragem.

Em nosso estudo as altas frequências em que o plasmídeo *tetM* foi detectado nas cepas de micoplasmas: *M. hominis* e espécies do gênero *Ureaplasma*

spp., estão em acordo com dados da literatura, os quais relatam um aumento crescente da resistência de cepas de *M. hominis* e de *Ureaplasma* spp à tetraciclina (CUMMINGS et al, 1990 ;ROBERTS et al, 1986).

Em decorrência da resistência a tetraciclina apresentada pelos micoplasmas, outras opções terapêuticas tem sido testadas. Ngnan et al., (2001) utilizaram fitas de E-test® para determinar a concentração inibitória mínima para tetraciclina, gatifloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina, clindamicina e aztreonam em 28 cepas de *M. hominis* isoladas de amostras clínicas. Os autores comprovaram a resistência intrínseca das cepas de *M. hominis* aos macrolídeos com 100% de cepas resistentes ao aztreonam (TAYLOR-ROBINSON; BÉBÉR, 1997).

A importância de se padronizar métodos de estudo de sensibilidade para diferentes antimicrobianos teve sua comprovação em um estudo realizado onde *M. hominis* foi isolado de líquido cefalorraquiano (LCR) de um recém-nascido. A espécie foi detectada por cultura e PCR, não tendo sido isolada outra bactéria. Apesar de rara, a meningite por *M. hominis* pode ser fatal (ALONSO-VEGA et al, 1997). Como os testes de sensibilidade para micoplasmas não estão estabelecidos, houve dificuldade de escolha da antibioticoterapia. A tetraciclina não foi utilizada por causa dos efeitos colaterais em neonatos. Desta forma os clínicos optaram pelo tratamento com ciprofloxacina e amoxicilina.

Este estudo foi importante por dois aspectos: 1) por ter revelado que certos clínicos já estão pensando no micoplasma como agente etiológico de meningite bacteriana; 2) a utilização de um esquema de tratamento eficaz com ciprofloxacina, alternativo à doxaciclina, a qual vinha sendo preconizada na literatura (WOLTHERS et al, 2003).

Dados da literatura sobre os resultados de resistência dos micoplasmas frente aos antibióticos, tem que ser avaliados com muito cuidado, uma vez que o perfil de suscetibilidade pode ser influenciado grandemente pela local de onde foi isolado (TAYLOR-ROBINSON; BÉBÉR, 1997).

Estudos como o nosso são importantes, ainda que não tenhamos correlacionado as espécies detectadas de micoplasmas à determinadas doenças. Apesar de não termos abordado os aspectos clínicos da infecção micoplásmica, pudemos constatar que 69,3% (113/163) das gestantes estavam colonizadas por *Ureaplasma* spp., e *M. hominis*. Considerando que a infecção micoplásmica, em maior ou menor grau, pode ter como consequência, não só complicações gestacionais mas também complicações com o próprio recém nascido, além do aumento da resistência desses microrganismos à tetraciclina, fica claro o quão é importante abordar o assunto.

6- Conclusão

- O cultivo dos materiais cervicais de gestantes mostrou altas taxas de positividade para micoplasmas: 69,3%. *M. hominis* foi isolado em 14,7% (24/163) e as espécies do gênero *Ureaplasma* spp., em 54,6% (89/163).
- A técnica de PCR constitui-se em uma ferramenta útil na identificação da espécie *Mycoplasma hominis* apresentando total concordância com a cultura.
- A análise da MBA por PCR para a diferenciação entre *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* é uma técnica eficaz. O predomínio da espécie *Ureaplasma parvum* foi evidente, correspondendo a 78,8% (89/113) do total de positivos para *Ureaplasma* spp.
- A técnica de RAPD mostrou-se eficaz em demonstrar a heterogeneidade da espécie *M. hominis*. Esta técnica é mais rápida e fácil de executar que a maioria das técnicas de estudo da heterogeneidade. Foi constatado que mais da metade (2/3) das amostras de *M. hominis* apresentaram cepas genomicamente heterogêneas.
- O estudo da resistência à tetraciclina mostrou-se de grande valia pois tanto a espécie *Mycoplasma hominis*, quanto as espécies do gênero *Ureaplasma* spp., apresentaram resistência significativa. Das amostras estudadas 41,7% apresentaram resistência a esse antibiótico que é o de escolha para tratamento dessas infecções no trato genitourinário.

7– Referências

- ABELE-HORN, M.; WOLF, C.; DRESSEL, P.; PAFF, F.; ZIMMERMANN, A. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.5, p.1199-1202, 1997.
- ABIVEN, P.; BLANCHARD, A.; SAILLARD, C.; KOBISCH, M.; BOVE, J.M.; A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hupopneumoniae* in experiment infected piglets. **Mol. Cell. Probes.**, London, v.6, n.5, p.423-429, 1992.
- ALFA, M.J.; EMBREE, J.E.; DEGAGNE, P.; OLSON, N.; LERTZMAN, J.; MACDODALD, K.S.; MACDONALD, N.T.; HALL, P.F. Transmission of *Ureaplasma urealyticum* from mothers to full and preterm infants. **Pediat. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v.14, n.5, p.341-345, 1994.
- ALONSO-VEGA, C.; WAUTERS, N.; VERMEYLEN, D.; MULLER, M.F.; term SERRUYS, E. A fatal case of *Mycoplasma hominis* meningoencephalitis in a full-neuborn. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, p.286-287, 1997.
- ARYA, O.P.; TONG, C.Y.; HART, C.A.; PRATT, B.C.; HUGHES, S.; ROBERTS, P.; KIRBY, P.; HOWEL, J.; McCORMICK, A.; GODDARD, A.D. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen? **Sex. Transm. Infect.**, London, v.77, p.58-62, 2001.
- BARBEYRAC, B.; BÉBÉAR, C.; TAYLOR-ROBINSON, D. PCR: preparation of DNA from clinical specimens. In: TULLY, J.G., RAZIN, S. **Mol. Diag. Proc.**

- Mycoplasma**., Diagnostic procedures. San Diego: Academic Press. V.2, p.61-62, 1996.
- BLANCHARD, A.; RAZIN, S.; KENNY, G.E.; BARILE, M.F. Characteristics of *Ureaplasma urealyticum* urease. **J. Bacteriol.**, Washington, v.170, n.6, p.2692-2697, 1988.
- BLANCHARD, A. Sequencing of *Ureaplasma urealyticum* urease genes: use of a UGA tryptophan codon. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.4, p.669, 1990.
- BLANCHARD, A.; CRABB, D.M.; DYBVIK, K.; DUFFY, L.B.; CASSEL, G.H. Rapid detection of *tetM* in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR: *tetM* confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline. **FEMS Microbiol. Letters**., Amsterdam, v.95, p.227-282, 1992.
- BLANCHARD, A.; YANEZ, A.; DYBVIK, K.; WATSON, H.L.; GRIFFITHS, G.; CASSEL, G.H. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.5, p.1358-1361, 1993.
- BROWN, M.B.; CASSELL, G.H.; McCORMACK, W.M. Measurement of antibody to *Mycoplasma hominis* by enzyme-linked immunoassay and detection of class-specific antibody response in women with postpartum fever. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.56, p.701-708, 1987.
- BRUS, F.; WAARDE, W.M.; SCHOOTS, C.; OETOMO, B.S. Fatal Ureaplasma pneumonia and sepsis in a newborn infant. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.150, p.782-783, 1991.

BUSCH, U.; NITSCHKO, H.; PFAFF, F.; HENRICH, B.; HESSEMAN, J.; ABELE-HORN, M. Molecular comparasion of *Mycoplasma hominis* strains isolated from colonized women and women with various urogenital infections. **Zent. Bl. Bakteriол.**, Stuttgart, v.289, p.879-888, 1999.

CASSELL, G.H.; WAITES, K.B.; DAVIS, J.K. Isolation of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from amniotic fluid at 16-20 weeks of gestation: potencial effect on outcome of pregnancy. **Sex. Trans. Dis.**, Philadelphia, v.10, p.294-302, 1983.

CASSELL, G.H.; WAITES, H.L.; CROUSE, D.T.; HARASAWA, R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.6, n.1, p.69-87, 1993.

CHAIN, W.; HOROWITZ, S.; DAVID, J.B.; INGEL, F.; EVINSON, B.; MAZOR, M. *Ureaplasma urealyticum* in the development of postpartum endometrites. **Eur. J. Obstet. Gynecology.**, Haarlem, v.109, p.145-148, 2003.

CORDOVA, C.M.M.; BLANCHARD, A.; CUNHA, R.A.F. Higher prevalence or urogenital mycoplasmas in human immunodeficiency virus- positive patients as compared to patients with other sexual transmitted diseases. **J. Clin. Lab. Anal.**, New York, v.14, p.246-253, 2000.

CHRISTIANSEN, C.; BLACK, F.T.; FEUNDT, E.A. Hibridization experiments with deoxyribonucleic acid from *Ureaplasma urealyticum* serovas I to VIII. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.31, p.259-262, 1981

CHRISTIANSEN, C.; CHRISTIANSEN, G.; RASMUSSEN, F. Heterogeneity of *Mycoplasma hominis* as detected by a probe for atp genes. **Isr. J. Med. Sci.** Israel, v.23, p.591-594, 1987.

- CUNHA, R.A.F.; KOIFFMAN, C.P.; SOUZA, D.H.; TAKEI, K. Clastogenic effects of different *Ureaplasma urealyticum* serovars on human chromosomes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.30, n.6, p.749-757, 1997.
- CUMMINGS, M.C.; McCORMACK, W.M. Increase in resistance of *Mycoplasma hominis* to tetracyclines. **Antimicrobial. Agents. Chemother.**, Bethesda, v.34, n.12, p.2297-2299, 1990.
- DAVIS, J.W.; VILLANUEVA, I. Enzyme differences in serovar clusters of *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma diversum*, and ovine ureaplasmas. **Zent. Bl. Bakteriол.**, Stuttgart, Suppl.20, p.661-665, 1990.
- DE SILVA, N.S.; QUINN, P.A. Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.29, p.1498-1503, 1991.
- DIENES, L.; EDSALL, G. Observation on the L-organism of Klienenger. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, v.36, p.740-744, 1937.
- DOMINGUES, D.; TAVIRA, T.; DUARTE, A.; SANCA, A.; PRIETO, E.; EXPOSTO, F. Genital mycoplasmas in women attending a family planning clinic Guiné-Bissau and their susceptibility to antimicrobial agents. **Acta. Trop.**, Basel, v.86, p.19-24, 2003.
- DONDERS, G.G.G.; BULCK, B.V.; CAUDRON, J.; LONDERS, L.; VEREECKEN, A.; SPITZ, B. Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.183, p.431-437, 1998.

- DUSSURGEET, O.; HENRY, A.; LEMERCIER, B.; ROULLAND-DUSSOIX, D. Polimerase chain reaction-based diagnosis of mollicute infection of commercial animal sera. **J. Microbiol. Methods.**, Amsterdam, v.20, p.125-135, 1994.
- EATON, M.D.; MEIKEJOHN, G.; HERICK, W.V. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: a filtrable agent transmissible cotton rats, hamsters, and chick embryos. **J. Exp. Med.**, New York, v.79, p. 649-667, 1944.
- EDWARD, D.C.; FREUND, E.A. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. **J. Gen. Microbiol.**, Colchester, v.14, p.197-207, 1967.
- ELSHIBLY, S.; KALLINGS, I.; HELLBERG, D.; MARDH, P.A. Sexual risk behaviour in women carries *Mycoplasma hominis*. **Brit. J. Obst. Gynaecol.**, Oxford, v.103, p.1124-1128, 1996.
- FENOLLAR, F.; GAUDUCHON, V.; CASALTA, J.P.; LEPIDI, H.; VANDENESCH, F.; RAOULT, D. Mycoplasma endocarditis: two case and a review. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.38, p.e21-e24, 2004.
- FREUNDT, E.A. *Mycoplasma hominis*: historical outline and taxonomy. **Sex. Transm. Infect. Supl.**, Londo, v.10, n.4, p.226-229, 1983.
- GERBER, S.; VIAL, Y.; HOHNFELD, P.; WITKIN, S. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in second-trimester amniotic fluid by polimerase chain reaction correlates with subsequent preterm labor and delivery. **Infect. Dis.**, Chicago, v.187, p.518-521, 2003.

- GLASS, J.J.; LEFKOWITZ, E.J.; GLASS, J.S.; HEINER, C.R.; CHEN, E.Y.; CASSEL, G.H. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. **NATURE**, London, v.407, p.757-762, 2000.
- GODRY, R.C. **Detecção de espécies incomuns de micoplasmas e do plasmídeo de resistência “tetM” em material cervical de gestantes por técnicas moleculares**. São Paulo, 2001.111p. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- GRAU, O; KOVACIC, R.; GRIFFAIS, R.; LAUNAY, V.; MONTAGNIER, L. Development of PCR-based assays for detection of two human mollicute species, *Mycoplasma penetrans* and *M. hominis*. **Mol. Cell. Probes**, London, v.8, p.139-148, 1994.
- HANNAN, P.C.T.; WOODNUTT, G. In vitro activity of gemifloxacin (SB 265805, LB 203049) against human mycoplasmas. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.45, p.367-69, 2000.
- HAY, P.E.; MORGAN, D.J.; ISON, C.A. A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy. **Br. J. Obstetr. Gynaecol.**, Oxford, v.101, p.1048-1053, 1994.
- HEGGIE, A.D.; JACOBS, M.R.; BUTLER, V.T.; BAILEY, J.E.; BOXERBAUM, B. Frequency and significance of isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from cerebrospinal fluid and tracheal aspirate specimens from low weight infants. **J. Pediatr.**, St. Louis, v.24, n.6, p.956-961, 1994.
- HENRY-SUCHET, J.; CATALAN, F.; LOFFREDO, V. Microbiology of specimens obtained by laparoscopy from controls and from patients with pelvic inflammatory diseases or infertility with tubal obstruction. *Chlamydia*

trachomatis and *Ureaplasma urealyticum*. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.138, p.1022, 1980.

IWASAKA, L.; WADA, T.; KIDERA, Y.; SIGIMORI, H.U. Genital mycoplasma colonization in neonatal girls. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, v.65, n.3, p.269-272, 1986. apud Prevalence and influence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in 218 African pregnant women and their infants. **Eur. J. Obstet. Gynecology**, Haarlem, v.56, p.95-101, 1986.

JENSEN, L.T.; THORSEN, P.; MOLLER, B.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Antigenic and genomic homogeneity of successive *Mycoplasma hominis* isolates. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.47, p.659-666, 1998.

JUDLIN, P. Mycoplasmes génitaux. **Gynecol. Obstet. Fertil.**, Paris, v.31, p.954-959, 2003.

KENYON, S.L.; TAYLOR, D.J. Broad-spectrum antibiotics for spontaneous preterm labour: the ORACLE II randomized trial. **Lancet**, London, v.357, p.981-990, 2001.

KLIENENBERGER, E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. **J. Pathol. Bacteriol.**, London, v.40, p.93-105, 1935.

KNOX, C.L.; TIMMS, P. Comparasion of PCR, Nested PCR, ans random amplified polymorphic DNA PCR for detection and typing of *Ureaplasma urealyticum* in specimens from pregnant women. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.10, p.3032-9, 1998.

- KNOX, C.L.; ALLAN J.A.; F.R.A.C.O.G., M.B.B.S., EDIRISINGHE W.R., STENZEL D., LAWRENCE F.A., PURDIE D.M., TIMMS P. *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. **Fertil. Steril.**, New York, v.80, p.921-929, 2003.
- KOCH, A.; BILINA, A.; TEODOROWICZ, L.; STARY, A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. **Wien. Klin. Woch.**, Wien, v.109, n.14-15, p.584-85, 1997.
- KONG, F.; ZHU, X.; WANG, W.; ZHOU, X.; GORDON, S.; GILBERT, G.L., Comparative analysis and serovars-specific identification of multiple-banded-antigen gene of *Ureaplasma urealyticum* Biovar 1. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.3, p.538-543, 1999.
- KONG, F.; ZHENFANG, M.A.; GREGORY, J.; GORDON, G.L., Species Identification and Subtyping *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-Based Assays. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.3, p.1175-79, 2000.
- KONG, F.; GILBERT, G.L. Postgenomic taxonomy of human ureaplasmas -- a case study based on multiple gene sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** Reading, v.54, p.1815-1821, 2004.
- KRAUSE, D.C.; TAYLOR-ROBINSON, D. Mycoplasmas which infect humans. In: MANILOFF, J.; McELHANEY, R.N.; FINCH, L.R.; BASEMAN, J.B. **Mycoplasma.: Molecular Biology and Pathogenesis**, Washington, ASM, p. 417-436, 1992.

- LADEFOGED, S.A.; CHRISTIANSEN, G. Physical and genetic of genomes of five *Mycoplasma hominis* strains by pulsed-field gel eletrophoresis. **J. Bacteriol.**, Washington, v.174, n.7, p.2199-2201, 1992.
- LADEFOGED, S. Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*. **APMIS.**, Copenhagen, Suppl.97, v.108, p.5-45, 2000.
- LIN, J.S.; KASS, E.H. Sorological reactions of *Mycoplasma hominis*: differences among mycoplasmacidal metabolic inhibition and growth agglutination test. **Infect. Immun.**, Washington, v.10, p.530-540, 1974.
- LO, S.C.; HAYES, M.M.; PIERCE, P.F.; KOTANI, H.; SHIH, J.W.K.; WANG, Y.H.L.O. Newly discovered mycoplasma isolated from patients with HIV. **Lancet.**, London, v.338, p.1415-1418, 1991.
- LUTON, D.; VILLE, Y.; LUTO-SIGY, A.; COUSIN, C.; NARRAIDO, B.; FASSASI-JARRETOU, A.; ESCARGUEL, C. Prevalence and influence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in 218 African pregnant women and their infants. **Eur. J. Obstet. Gynecol.**, Haalen, v.56, p.95-101, 1994.
- MITSUNARI, M.; YOSHIDA, S.; DEURA, I.; HORIE, S.; TSUKIHARA, S.; HARADA, T.; IRIE, T.; TERAOKAWA, N. Cervical *Ureaplasma urealyticum* colonization might be associated with increased incidence of preterm delivery in pregnant women without prophlogistic microorganisms on routine examination. **J. Obstet. Gyneacol. Res.**, Tokyo, v.31, n.1, p.16-21, 2005.
- MOROWITZ, H.J.; WALLACE, D.C. Genoma siza and life cycle of the mycoplasma . **Am. N.Y. Acad. Sci.**, New York, v.225, p.63-73, 1973
- NEASSENS, A.; FOULON, W.; BREYNAERT, J.; LAUWERS, S. Seretypes of *Ureaplasma urealyticum* isolated from normal pregnant women and patients

with pregnancy complications. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, p.319-322, 1988.

NELSON, S.; MATLOW, A.; JOHNSON, G.; TH'NG, C.; DUNN, M.; QUINN, P. Detection of *Ureaplasma urealyticum* in endotraqueal tube aspirates from neonates by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.5, p.1236-1239, 1998.

NGAN C.C.L.; LIM, T.; CHOO, C.M.; TOH, G.; LIM, Y.S. Susceptibility testing of Singapore strains of *Mycoplasma hominis* to tetracycline, gatifloxacin, moxifloxacin, ciprofloxacin, clindamicyn, and azithromycin by Etest method. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** New York, v.48, p.207-210, 2004.

NICOLSON, G.L.; NASRALLA, M.T.; NICOLSON, N.L. The patogenesis and treatment of mycoplasmal infections. **Antimicrobics. Infect. Dis.newsl.** New York, v.17, n.11, p.81-88, 1998.

NICOL, C.; EDWARD, D.G. Role of organisms of the pleuropneumonia group in human genital infections. **Br. Vener. Dis.**, London, v.29, p.141-150, 1953.

NOCAR & ROUX. Le microbe de la péripleumonie. **Ann. Instit. Pasteur.**, Paris, v.12, p.240-62, 1898.

ODENDAAL, H.J.; POPOV, I.; SCHOEMAN, J.; GROVE, D. Preterm labour – is *Mycoplasma hominis* involved? **S. Afr. Med. J.**, Capetown, v.92, n.3, p.235-237. 2002.

PAIGE, D.M.; AUGUSTYN, M.; ADIH, W.K.; WITTER, F.; CHANG, J. Bacterial vaginosis and preterm birth: a comprehensive review of the literature. **J. Nurse. Midwifery.**, New York, v.43, n.2, p.83-89, 1998.

- PERNI, S.C.; VARDHANA, S.; KORNEEVA, I.; TUTTLE, S.L.; PARASKEVAS, L.R.; CHANSEN, S.T.; KALISH, R.B.; WITKIN, S.S. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in midtrimester amniotic fluid: association with amniotic fluid cytokine levels and pregnancy outcome. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.191, p.1382-1386, 2004.
- PITCHER, D.; SILLIS, M.; ROBERTSON, J. Simple method for determining biovar and serovar types of *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates using PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.5, p.1840-1844, 2001.
- POVLSEN, K.; THORSEN, P.; LIND, I. relationship of *Ureaplasma urealyticum* biovars to the presence or absence of bacterial vaginose in pregnant women and the time delivery. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, Weisbaden, v.20, p.65-67, 2001.
- PURCELL, R.H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; WONG, D.; CHANOCK, R.M. Color test for the measurement of antibody to T-strains mycoplasmas. **J. Bacteriol.** Washington, v.92, p.6-12, 1966.
- RAHERISON, S.; GONZALES. P.; RENAUDIN, H.; CHARRON, A.; BÉBÉR, C.; BÉRBÉR, C.M. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. **Antimicrobial Agents Chemother.** Bethesda, v.46, n.3, p.672-679, 2002.
- RAZIN, S. *Mycoplasma* taxonomy studied by eletrophoresis of cell proteins. **J. Bacteriol.**, Washington, v.96, p.687-694, 1968.
- RAZIN, S.; FREUNDT, E.A. The mycoplasmas. In: **BERGEY's Maual of Systematic Bacteriology**, Baltimore, Willians & Wilkins, v.1, p.740-93, 1984.

- RAZIN, S. Molecular biology and genetics of mycoplasma (*Mollicutes*). **Microbiol. Rev.**, Washington, v.49, n.4, p.419-455, 1985.
- RAZIN, S. Mycoplasma taxonomy and ecology. **Mycoplasmas molecular biology and pathogenesis.**, Washington: ASM, Cap.1, p.3-22., 1992
- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v.62, n.4, p.1094-1156, 1998.
- ROBERTS, M.C.; KOUTTSKY, L.A.; HOLMES, K.K.; LeBLANC, D.J.; KENNY, G. Tetracycline-resistant *Mycoplasma hominis* strains contain Streptococcal *tetM* sequences. **Antimicrobial. Agents. Chemother.** Bethesda, v.28, n.1, p.141-143, 1985.
- ROBERTS, M.C.; KENNY, G. Dissemination of *tetM* tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. **Antimicrobial. Agents. Chemother.**, Bethesda, v.29, n.2, p.350-352, 1986
- ROBERTSON, J.; STEMKE, G.W. Expanded serotyping scheme for *Ureaplasma urealyticum* strains isolates from humans. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v.15, p.873-878, 1982.
- ROBERTSON, J.A.; VERKIS, A.; BÉBÉ, C.; STEMKE, W.G. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of *Ureaplasma urealyticum*. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v.31, p.824-830, 1993.
- ROBERTSON, J.; HOWARD, L.A; ZINNER, C.L.; STEMKE, G.W. Comparison of 16S rRNA genes within the T960 and parvo biovars of ureaplasmas isolated

from humans. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.44, n.4, p.836-888, 1994.

ROMERO, R.; CHAIWORAPONGSA, T.; KUIVANIEMI, H.; TROMP, G. Bacterial vaginosis, the inflammatory response and the risk of preterm birth: a role for genetic epidemiology in prevention of preterm birth. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.190, p.1509-1519, 2004.

ROTTEM, S. Interaction of micoplasmas with host cells. **Physiolol. Rev.**, Washington, v.83, p.417-432, 2003.

RUITER, M.; WENTHOL, H.M.N. The occurrence of a pleuropneumonia-like organism in fuso-spillary infections of the human genital mucosa. **J. Invest. Dermatol.** V.18, p. 313-325, 1952.

SÁNCHEZ, P.J., REGAN, J.A. Vertical transmission of *Ureaplasma urealyticum* in full term infants. **Pediat. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v.6, p.825-828, 1987.

SHEPARD, M.C. The recovery of pleuropneumonia-like organisms from negro men with and without non-gonococcal urethritis. **Am. J. Syph. Gonorrhea Vener. Dis.**, St. Louis, v.38, p.113-124, 1954.

SHEPARD, M.C. Standar fluid medium U10 for cultivation and maintenance of *Ureaplasma urealyticum*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.24, p.160-171, 1974.

SHEPARD, M.C. Standard fluid medium U10 for cultivation and maintenance of *Ureaplasma urealyticum*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.3, n.6, p.613-625, 1976.

- SHEPARD, M.C.; LUCEFORD, C.D. Diferencial agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T Mycoplasma) in primary culture of clinical material. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.3, n.6, p.613-625, 1976.
- SOROKA, A.E., MOMYNALIEV, K.T., TARASKINA, A.M., SAVICHEVA, A.M., GOVORUM, V.M. Genetic heterogeneity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates detected observation of patients with recurrent urogenital inflammation. **Bull. Exp. Biol. Med.**, New York, v.132, n.1, p.663-665, 2001.
- STYLER, M.; SHAPIRO, S.S. Mollicutes (mycoplasma) in infertility. **Fertil. Steril.** Birmingham, v.44, n.1, p1-12, 1985.
- SWENSON, C.E.; VANTTAMOUNT, J.; DUNBAR, B.S. Specific protein differences between strains of *Ureaplasma urealyticum* as determined by two-dimensional gel eletrophoresis and sensitive silver stain. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.33, p.417-421, 1983.
- TARA, P.N.; THORTON, S. Current medical therapy in the prevention and treatment of preterm labour. **Semin. Fetal. Neonatal. Med.**, Amsterdam, v.9, p.481-489, 2004.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; MUNDAY, P.E. Mycoplasmal infection of the female genital tract and its complication. In: HARE, M.J., ed. **Gen. Infect. Women.** Edinburg: Churchill., Livingstone, p.228-247, 1988.
- TAYLOR-ROBINSON, D. Infections due *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: An update. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.23, p.671-684, 1996a.

- TAYLOR-ROBINSON, D. Diagnosis of sexually transmitted diseases. In: TULLY, J.G., RAZIN, S. **Mol. Diagn. Proc. Mycoplasm.**, San Diego: Academic Press, v.2, p.225-236, 1996b.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; BEBEAR, C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.40, n.5, p.622-630, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; FURR, P. Genital mycoplasma infection. **Wien. Klin. Woch.**, Wien, v.109, n.14-15, p.578-583, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; FURR, P.M. Update on sexually transmitted mycoplasmas. **Lancet.**, London, v.351, p.12-15, 1998.
- TAYLOR-ROBINSON, D.; FURR, P.M. Observation on the antibiotic treatment of experimental induced mycoplasma infections in mice. **J. Antimicrob. Chemother.**, Oxford, v.45, p.903-907, 2000.
- TENG, L.J.; ZHENG, X.; GLASS, J.L.; WATSON, H.L.; TSAI, J., CASSEL, G.H. *Ureaplasma urelyticum* biovar specificity and diversity are encoded in multiple-banded antigen gene. **J. Clin. Microbiol.** Washington., v.6, p.1464-1469, 1994.
- TULLY, J.G.; TAYLOR-ROBINSON, D.; COLE, R.M.; ROSE, D.L. A new discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **Lancet.** London, v.1, p.1288-1291, 1981.
- VAN KUPPEVELD, F.J.M.; VAN DER LOGT, J.T.M.; ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J.; QUINT, W.G.V.; NIESTERS, H.G.M.; GALAMA, J.M.D.; MELCHERS, W.J.G. Genus and species-specific identification of mycoplasma

- by 16S rRNA amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.58, p.2606-2615, 1992.
- VELLECA, W.M.; BIRD, B.R.; FORRESTER, F.T. Arginine broth medium for growth of *Mycoplasma hominis*. In: **Lab. Diagn. Mycopl. Infect.** Atlanta, U.S. Department of Health, Education and Welfare, C.D.C., p.120, 1979.
- WAITES, K.B.; DUFFY, L.B.; CROUSE, D.T.; DWORSKY, M.E.; STRANGE, M.J.; NELSON, K.G.; CASSELL, G.H. Mycoplasmal infection of cerebrospinal fluid in newborn infants from community hospital population. **Pediat. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v.9, n.4, p.241-245, 1990.
- WAITES, K.B.; CANUPP, K. Evaluation of BacT/ALERT system for detection of *Mycoplasma hominis* in simulated blood cultures. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.12, p.4328-4331, 2001.
- WAITES, K.B.; TALKINGTON, D.F.; *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, v.17, n.4, p.697-728, 2004.
- WOESE, C.R.; MANILOFF, J.; ZABLEN, L.B. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** Washington, v.77, n.1, p.494-498, 1980.
- WOLTERS, K.C.; KORNELISSE, R.; PLATENKAMP, G.J.J.M.; LEM, M.I.S.; SCHEE, C.; HARTWIG, N.G.; VERDUIM, C.M. A case of *Mycoplasma hominis* meningo-encephalitis in a full-term infant: rapid recovery after start of treatment with ciprofloxacin. **Eur. J. Pediat.**, Berlin, v.162, p. 514-516, 2003.

ZHANG, Q.; WISE, K. Molecular basis and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesion encoded by divergent *vaa* genes. **Infect. Immun.**, Washington, v.64, n.7, p.2737-2744, 1996.

ZHENG, X.; TENG, L.J.; WATSON, H.L.; GLASS, J.I.; BLANCHARD, A.; CASSEL, G.H. Small repeating units within the *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, n.3, p.891-898. 1995.

De acordo com a norma NBR6023/2001 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (abent). As abreviações dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 2002.

ANEXO 01**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO**

Projeto de pesquisa:

Este projeto visa determinar a prevalência de espécies de micoplasma e ureaplasma em pacientes que

procurarem o Hospital Universitário com queixa clínica, e mulheres que procurarem, este serviço para a realização de exames preventivos.

Estas bactérias têm como habitat primário primordialmente a superfície da mucosa do trato geniturinário sendo responsável por 50% das uretrites não gonocócicas no homem, e na mulher está envolvida em diversas patologias tais como endometrites, abortos espontâneos, infertilidade, nascimentos de natimortos e prematuros de baixo peso.

Este estudo será realizado em conjunto com o Serviço Ambulatorial de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas. As amostras do material cervical (para a realização da cultura e PCR) serão colhidas das pacientes no momento que a mesma for colher os exames ginecológicos solicitados pelo médico, não havendo nenhum prejuízo ou desconforto para a mesma.

A participação será voluntária e a qualquer momento pode negar-se a continuar participando do projeto sem sofrer qualquer dano ou prejuízo por parte da pesquisadora ou do hospital e será garantido o anonimato dos participantes, bem como o sigilo dos dados, os quais serão exclusivamente utilizados para este estudo.

Os resultados dos exames serão encaminhados aos médicos da Clínica Ginecológica e Obstetrícia.

Todo o material utilizado na coleta da amostra será estéril não havendo, portanto, risco de contaminação.

Tendo sido informado através da exposição acima (*) e ciente de que minha recusa em nada afetará meu acompanhamento hospitalar, declaro meu expresso consentimento em participar do presente estudo.

Eu, Lílían Ferri Passadore, pesquisadora responsável por esse projeto, coloco-me a disposição para esclarecer qualquer dúvida ou problema e meu telefone de contato é 3039-9424

Nome:
Endereço:
RG: Data:
Assinatura do participante:
Assinatura do pesquisador:

(*) Caso a participante tenha limitações para a leitura do documento, este será lido por um familiar, ou membro da Coleta.

ANEXO 02**MEIOS DE CULTURA:****Meio de transporte A₃xb (SHEPARD, 1976, mod)**

Trypic Soy Broth (DIFCO) -----	3,0g
Cloridrato de L-cisteína a 4%-----	0,25ml
Água MilliQ®-----	98ml

A mistura acima foi autoclavada a 120°C por 20 minutos, e após resfriado, foi suplementado de forma estéril:

Soro fetal bovino-----	1,0 ml
Anfotericina B-----	2,5µg/ml
Penicilina G-----	1.000UI/ml

Meio líquido U10 (SHEPARD, 1974, mod)

PPLO broth-----	47 g
Água MilliQ®-----	70ml

O pH foi ajustado para 5.5. O meio autoclavado a 120°C por 20 minutos, e após ser resfriado, foi suplementado de forma estéril com:

Soro de cavalo estéril e inativado-----	20ml
Cloridrato de L-cisteína 2%-----	10ml
Uréia 10%-----	0,5ml
Suplemento VX-----	1,0ml
Penicilina G-----	1.000UI/ml
Vermelho de fenol 1%-----	0,1ml
Suplemento GHL-----	0,1ml

Meio líquido de Arginina (VELLECA 1979, mod)

PPLO broth	1,4g
Água MilliQ®	70ml

O pH foi ajustado para 7,5. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 minutos, e após ser resfriado, foi suplementado de maneira estéril com:

Soro estéril e inativado de cavalo	20ml
Extrato fresco de levedura 25%	10ml
Suplemento VX	1,0 ml
Vermelho de fenol a 0,4%	0,3ml
Penicilina G	1.000UI/ml
Arginina a 30%	0,66ml

Meio sólido A7 (SHEPARD 1976, mod)

PPLO broth	2,1g
MnSO ₄ H ₂ O	0,015g
Água MilliQ®	63ml

O pH do meio foi ajustado para 5.5. Após o ajuste do pH foi adicionado 1,0g de Ágar Noble. O meio foi autoclavado a 120°C por 20 minutos, e após resfriado foi adicionado de maneira estéril:

Soro de cavalo estéril e inativado	20ml
Extrato fresco de levedura a 25%	10ml
Uréia 10%	1,0ml
Glicose 10%	5ml
Suplemento VX	1,0ml
PenicilinaG	1.000UI/ml

ANEXO 03

Aprovação do Conselho de Ética do Hospital Universitário.

São Paulo, 24 de junho de 2002.

Il^{mo(a)} S^{ra}**Lilian Ferri Passadore**

Serviço de Laboratório Clínico

Hospital Universitário

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Referente: Projeto de Pesquisa “Determinação da frequência da classe *Mollicutes* no trato urogenital, seus sorotipos e subtipos através de técnicas moleculares e de cultivo em material cervical” – **Cadastro:** 264/02

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião de 21 de junho de 2002, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como APROVADO, assim como o Termo de Consentimento Pós-Informado.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais (a cada 90 dias) e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196 de 10-10-1996, inciso IX, letra “c”).

O primeiro relatório do referido projeto está previsto para 21 de setembro de 2002.

Atenciosamente,

Dr. Sérgio Gomes de Souza
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP