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

**ESPÉCIES EMERGENTES DE MICOPLASMAS DO TRATO
GENITURINÁRIO EM PACIENTES ASSOCIADOS OU NÃO À
INFECÇÃO PELO HIV-1, DETECTADOS POR TÉCNICAS
SOROLÓGICAS, DE CULTIVO E DE BIOLOGIA MOLECULAR.**

CAIO MAURICIO MENDES DE CORDOVA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Prof^a Dr^a Regina Ayr Flório da Cunha

São Paulo

1999

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

M538e Mendes de Cordova, Caio Mauricio
Espécies emergentes de micoplasmas do trato geniturinário em
pacientes associados ou não à infecção pelo HIV-1, detectados por
técnicas sorológicas, de cultivo e de biologia molecular / Caio
Mauricio Mendes de Cordova. -- São Paulo, 1999.
122p.
Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas.
Orientador: Cunha, Regina Ayr Flório da

1. Micoplasma : Bacteriologia médica : Identificação
2. Microorganismos patogênicos : Medicina 3. Aids:
Medicina I. T. II. Cunha, Regina Ayr Flório da, orientador.

616.014 CDD

CAIO MAURICIO MENDES DE CORDOVA

**Espécies emergentes de micoplasmas do trato geniturinário
em pacientes associados ou não à infecção pelo HIV-1,
detectados por técnicas sorológicas, de cultivo e de biologia
molecular.**

COMISSÃO JULGADORA
Dissertação de Mestrado

Profª Drª Regina Ayr Flório da Cunha
Presidente e Orientadora

Prof. Dr. Antônio Guilherme Moreira Porto
1º Examinador

Profª Drª Kioko Takei
2º Examinador

São Paulo, 21 de junho de 1999.

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

Apoio Financeiro: bolsa CAPES e
FAPESP processo nº 97/09977-2

"Há mais coisas entre o céu e a Terra
do que imagina nossa vã filosofia."
William Sheakspeare

A Deus,
pelas oportunidades que tem me oferecido,
e pela sabedoria de poder reconhecê-las
e aproveitá-las.

À meus pais,
pela força, apoio, e exemplo de vida.

A Simone,
pelo amor, apoio e compreensão

A Reca, mais que uma mestra,
uma amiga, companheira, e
exemplo de perseverança.

AGRADECIMENTOS

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

A Profª Drª Kioko Takei, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo apoio essencial desde o difícil começo, e pela colaboração na realização de nossos trabalhos.

A Profª Drª Adelaide José Vaz, da Disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo apoio, colaboração e sugestões por ocasião do Exame de Qualificação.

A Profª Drª Sueko Takimoto Masaoka e Drª Adele Caterino de Araújo, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pelas sugestões, críticas e colaboração no Exame de Qualificação, que nos permitiram aprimorar este trabalho.

A Profª Drª Yoshimi I. Yamamoto, da disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Mauricio Alexandre Rampezzo Miranda, do Laboratório do Hospital da Polícia Militar de São Paulo, pela disposição e auxílio na obtenção das amostras.

Ao Dr. Caio Rosenthal, do Serviço de Moléstias Infeciosas do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, pela colaboração na obtenção das amostras.

A Drª Célia Otsuka Takiy, da PROBAC, que gentilmente se incumbiu da obtenção dos soros hiperimunes anti *M. hominis* e *M. penetrans*.

Ao Dr. Alain Blanchard, do Instituto Pasteur, Paris, França, pela doação de cepas, auxílio na solução dos problemas, e receptividade para colaboração em trabalhos futuros.

A Drª Heloísa Melles, do Setor de Clamídias e Rickétsias do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, pela colaboração em nossos projetos, e pela disposição de ter me ensinado.

A Drª Elizabeth Natal de Gaspari, da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, pela colaboração, principalmente no difícil começo.

Ao Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo, do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal de São Paulo, SP, pelo apoio e colaboração durante todo o trabalho.

A Ednéia, por sua amizade e apoio no momento da escolha.

A todos os amigos, que compartilham os bons momentos, e tem a paciência de nos ouvir nas horas mais difíceis.

A todos os pacientes, que voluntariamente aceitaram ceder suas amostras e participar deste trabalho, principalmente aqueles infectados pelo HIV, muitos já em outro plano, sem os quais este não seria possível.

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

Meus sinceros agradecimentos

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	4
1.- INTRODUÇÃO	7
2.- OBJETIVOS	25
3.- MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1- Pacientes	28
3.2.- Amostras	28
3.3.-Diagnóstico da infecção pelo HIV-1	28
3.4.- Avaliação da relação das células CD4+ e CD8+ no sangue dos indivíduos infectados pelo HIV	29
3.5.- Processamento das amostras	
3.5.1.-Raspados uretrais	29
3.5.2.-Urina	30
3.5.3.-Soro	30
3.6.- Cultura de micoplasmas	30
3.7.- Quantificação dos isolados positivos para <i>U. urealyticum</i> e <i>M. hominis</i>	31
3.8.- Identificação dos isolados através do cultivo e sorologia	31
3.8.1.- Imunodifusão dupla de Ouchterlony para <i>M. hominis</i>	32

3.8.2.- Obtenção de antígeno total de cepa padrão de <i>M. hominis</i> para imunização	32
3.8.3.- Obtenção de soro hiperimune de coelho	33
3.9.- Técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos micoplasmas	33
3.9.1.-Tratamento das amostras para PCR	33
3.9.2.-Protocolo básico para a PCR	34
3.9.3.-PCR para detecção do gene da globina humana	35
3.9.4.-PCR Multiplex para a classe <i>Mollicutes</i>	35
3.9.5-PCR para identificação de <i>M. hominis</i>	36
3.9.5.1.-Verificação da especificidade da PCR para <i>M. hominis</i>	37
3.9.6.-PCR para identificação de <i>U. urealyticum</i>	37
3.9.7.-PCR para detecção de <i>Mycoplasma penetrans</i>	38
3.9.7.1.-Verificação da especificidade da PCR para <i>M. penetrans</i>	39
3.9.8.-Detecção de <i>M. genitalium</i> pela técnica da PCR	39
3.9.8.1.-Verificação da especificidade da PCR para <i>M. genitalium</i>	39
3.9.9.-Detecção de <i>M. fermentans</i> pela técnica da PCR	40
3.9.9.1.-Verificação da especificidade da PCR para <i>M. fermentans</i>	40
3.9.10.-Detecção de <i>M. pneumoniae</i> por PCR	41
3.9.11.- Detecção dos produtos de PCR	41
3.10.-Metodologia utilizada na padronização dos testes de ELISA e imunoblot para detecção de anticorpos anti- <i>M. penetrans</i>	
3.10.1.-Obtenção de antígeno total de <i>M. penetrans</i>	42
3.10.2.-Obtenção da fração LAMP (<i>Lipid Associated Membrane Proteins</i>) de <i>M. penetrans</i>	42
3.10.3.-Caracterização dos antígenos de <i>M. penetrans</i>	
3.10.3.1.- SDS-PAGE da fração LAMP	43
3.10.3.2.-Transferência da fração LAMP de <i>M. penetrans</i> separada por SDS-PAGE para	

membrana de nitrocelulose	44
3.10.3.3.-Imunoblot com soro hiperimune de coelho e soro controle positivo humano	44
3.10.4.-Pesquisa de anticorpos séricos anti- <i>M. penetrans</i> por ELISA	45
3.10.5.- Imunoblot para <i>M. penetrans</i>	45
3.10.6.-Verificação da especificidade do imunoblot para <i>M. penetrans</i>	46
3.11.-Análise estatística	46
4.- RESULTADOS	47
4.1.-Cultura de micoplasmas	48
4.2.-Quantificação dos isolados	49
4.3.-Identificação dos isolados	50
4.4.-Detecção de mollicutes por PCR com o uso de <i>primers</i> genéricos	55
4.5.-Relação da positividade da detecção de mollicutes por cultura e PCR	57
4.6.-Detecção de mollicutes por PCR, nas amostras dos indivíduos HIV-positivos e negativos com o uso de <i>primers</i> específicos	
4.6.1.- <i>M. hominis</i>	58
4.6.2.- <i>U. urealyticum</i>	59
4.6.3.- <i>M. genitalium</i>	59
4.6.3.1.-Verificação da especificidade da PCR para <i>M. genitalium</i>	60
4.6.4.- <i>M. fermentans</i>	61
4.6.4.1.-Verificação da especificidade da PCR para <i>M. fermentans</i>	62
4.6.5.- <i>M. penetrans</i>	62
4.6.5.1.-Verificação da especificidade da PCR para <i>M. penetrans</i>	63
4.6.6- <i>M. pneumoniae</i>	64

4.7.-Caracterização dos antígenos de <i>M. penetrans</i>	
4.7.1.-Eletroforese em SDS-PAGE	65
4.7.2.-Imunoblot com soros hiperimunes de coelho	65
4.7.3.-Imunoblot com soros humanos	65
4.8.-Detecção de anticorpos séricos anti- <i>M. penetrans</i> por ELISA	67
4.9.-Relação dos níveis de células CD4 e CD8 dos indivíduos HIV-positivos com anticorpos anti- <i>M. penetrans</i>	73
4.10.-Observação da reatividade dos soros positivos por ELISA com o peptídeo de 38 kD de <i>M. penetrans</i> por imunoblot	74
4.11.-Verificação da especificidade do imunoblot para <i>M. penetrans</i>	75
 5.- DISCUSSÃO	 78
 6.- CONCLUSÕES	 91
 7.- REFERÊNCIAS	 93
 ANEXOS	 108

Abreviaturas e termos utilizados nesta dissertação

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATCC – "American Type Culture Collection"

AZT - zidovudina

bp – pares de base

CCU – "Color Changing Units"

CD4+ - linfócitos T CD4 positivos

CD8+ - linfócitos T CD8 positivos

CDC – "Center for Diseases Control"

dNTP – deoxinucleotídeo-trifosfato

D.O. – densidade ótica

DNA – ácido deoxiribonucleico

DST – doença sexualmente transmissível

ELISA – "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"

G+C – guanina + citosina

HHV8 – Herpes vírus humano tipo 8

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HTLV-1/2 – vírus da leucemia de células T humana tipos 1/2

kD – kilo Dalton

LAMP – "Lipid Associated Membrane Proteins"

LTR – "Long Terminal Repeat"

NF- κ B – fator de necrose κ B

PAP – Pneumonia Atípica Primária

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PID – Doença Pélvica Inflamatória

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

PPLO – "Pleuropneumonia Like Organisms"

RAPD – "Random Amplified DNA"

rRNA – ácido ribonucleico ribossomal

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

TBC – tampão bicarbonato/carbonato

TNF – fator de necrose tumoral

mg - miligrama

mL - mililitro

μg - micrograma

μL - microlitro

μM – micromolar

fg - fentograma

RESUMO

RESUMO

Este trabalho procurou definir a existência de espécies emergentes de micoplasmas (*Mycoplasma genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans*) em indivíduos HIV-positivos e indivíduos com queixa clínica de rerite, por não haver dados a esse respeito no Brasil. A pesquisa das espécies mais conhecidas (*M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*), cuja metodologia para sua detecção já está bem estabelecida, proporcionou uma visão global da participação das espécies de importância clínica conhecidas até o momento.

Foram avaliadas amostras de raspado uretral e primeiro jato urinário de 106 indivíduos HIV-positivos e 110 indivíduos HIV-negativos com DST, no total de 212 e 220 amostras do primeiro e do segundo grupo, respectivamente. Deste modo, foram submetidas a análise 432 amostras para pesquisa de micoplasmas por cultura e PCR. Para pesquisa de anticorpos séricos anti- *M. penetrans*, foram obtidas amostras de soro de cada indivíduo dos dois grupos estudados, bem como de 86 doadores de sangue saudáveis para cálculo do limite de reatividade do ELISA.

As taxas de infecção obtidas em nosso estudo, considerando os resultados do cultivo e da PCR, nos indivíduos HIV-positivos, foram: 2,8% para a espécie *M. genitalium*, 5,7% para *M. fermentans*, e 6,6% para *M. penetrans*. Nos indivíduos com queixa de DST, os valores encontrados foram: 9,1% para *M. genitalium* e 0,9% para *M. fermentans*, não tendo sido observado nenhum caso positivo para *M. penetrans*. Estes últimos resultados revelam que, apesar da pouca importância dada até então às três espécies, estas responderam, no total, por taxas de infecção de 15,1% e 10,0%, respectivamente, nos grupos HIV-positivo e DST. Estas taxas são bastante significativas quando comparadas

com as observadas para as espécies *M. hominis* e *U. urealyticum*, ou seja, 26,4% e 14,5% em cada grupo, respectivamente.

Nossos dados demonstraram uma frequência significativa de anticorpos anti- *M. penetrans*: 25,5% no grupo de indivíduos HIV-positivos, 17,3% no grupo de DST, e 2,3% no grupo controle para IgG; 3,8%, 9,1% e 5,8% para IgM, e 15,1%, 17,3% e 1,2% para IgA, respectivamente. Estes dados, aliados aos resultados de PCR, confirmam a presença de *M. penetrans* em nosso meio, infectando principalmente os indivíduos HIV-positivos. A presença desta espécie e também de *M. fermentans*, detectadas por PCR, denotam que muito pouco se conhece sobre o envolvimento destes micoplasmas com o HIV e que ainda não lhes é dada a devida importância na rotina médica. A associação definitiva de sua infecção com a progressão da AIDS, ainda a ser alcançada, e a demonstração em nossa população da infecção por *M. genitalium* em indivíduos com queixa de uretrite não-gonocócica, abre novos horizontes para o estudo da participação dos micoplasmas na etiologia das doenças humanas no país.

ABSTRACT

Mycoplasma emergent species of the genitourinary tract in patients associated or not to HIV-1 infection, detected by serologic, culture and molecular biology techniques.

The aim of this work was to define the existence of emergent mycoplasma species, such as *Mycoplasma genitalium*, *M. fermentans* and *M. penetrans*, in HIV-1-infected and HIV-negative individuals with Sexually Transmitted Diseases (STD), because there are no data concerning this subject in Brazil. The research about well-known species, such as *Ureaplasma urealyticum* and *M. hominis*, of which detection techniques are well established, provided a comprehensive view of the participation of *Mollicutes* in human disease.

We evaluated urethral swabs and urine samples from 106 HIV-1-infected and 110 HIV-negative individuals with clinical symptoms of non-gonococcal urethritis, summing up 212 samples from the first group, and 220 from the second. Therefore, we tested a total of 432 samples to mycoplasma detection by culture and PCR. To detection of serum antibodies to *M. penetrans*, we obtained blood samples of each patient from the groups studied, as well as from 86 healthy blood donors to calculate the ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) cut-off value.

The rates of infection obtained in our study, considering the culture and PCR results, in the HIV-infected individuals were: 2.8% for *M. genitalium*, 5.7% for *M. fermentans*, and 6.6% for *M. penetrans*. In the STD group, the rates were: 9.1% for *M. genitalium* and 0.9% for *M. fermentans*. We did not observed any positive case for *M. penetrans* in this group, and no positive case for *M. pneumoniae* in both groups, in spite of the existence of some reports of its detection in the genitourinary tract. This results reveal that they account, in the total, for infection rates of 15.1% and 10%, respectively, in the HIV-infected and the STD groups. These rates are very significant when compared to the ones observed for the species *M. hominis* and *U. urealyticum*, i.e., 26.4% and 14.5% in each group, respectively.

Our results also show a significant antibody frequency to *M. penetrans*: 25.5% in the HIV-infected group, 17.3% in the STD group, and 2.3% in the control group for IgG; 3.8%, 9.1% and 5.8% for IgM, and 15.1%, 17.3% and 1.2% for IgA, respectively. These data, together with the PCR results, confirm the presence of *M. penetrans* in our population, mainly infecting HIV- positive patients. The presence of this species, and also of *M. fermentans*, detected by PCR, demonstrate that very little is known about the role of this mycoplasma species in HIV infection, and they are not given the appropriate importance in clinical routine in Brazil. The definitive association between mycoplasma infection and the progression of AIDS is still to be established. The demonstration of *M. genitalium* infection in individuals with clinical symptoms of non-gonococcal urethritis in our population, may open new insights in the study of the role of mycoplasmas in the ethiology of human diseases in this country.

INTRODUÇÃO

1.- INTRODUÇÃO

1.1- HISTÓRICO

O estudo dos micoplasmas começou no final do século XIX quando Louis Pasteur foi convidado pela Sociedade Agrícola de Melun, 40 quilômetros à sudeste de Paris, para investigar as causas de uma pleuropneumonia contagiosa que atingia o gado bovino. Esta doença era muito grave nestes animais, sendo relatada na Europa desde 1693. Em 1743 foi responsável por uma epidemia dramática na Suíça, e na Inglaterra relatos indicam que desde 1860 a doença havia sido detectada, vitimando desde então cerca de 60.000 animais (FOSTER, 1934).

A contribuição de Pasteur foi ter desenvolvido uma técnica onde o agente da pleuropneumonia recolhido dos pulmões infectados de animais acometidos pela doença era obtido como um produto puro, livre de outros germes. Pasteur tentou cultivar o agente, porém constatou que o microrganismo não crescia nos meios convencionais utilizados até então (SABIN, 1941).

Alguns anos mais tarde, em 1898, NOCARD e ROUX, foram os primeiros a cultivar o agente da pleuropneumonia. Utilizando a técnica de purificação desenvolvida por Pasteur, o agente foi primeiramente cultivado em sacos coloidais inseridos na cavidade peritoneal de coelhos. Em seguida, o agente pode ser cultivado em meios acrescidos de uma parte de soro bovino ou de coelho para vinte partes de caldo.

BORREL et al., em 1910, foram os primeiros a cultivar o agente em meio sólido, descrevendo sua morfologia colonial característica: "No centro, aparece uma zona bem definida, esférica, medindo 0,2 mm de

diâmetro, granular e de cor marrom claro, na forma de um bico de seio opaco no centro da colônia". Deste modo, a morfologia que hoje chamamos de forma de ovo frito, estava descrita desde 1910. Confirmaram também que o microrganismo crescia somente na presença de soro animal e demonstrando, o que é considerado sua maior contribuição, que o organismo passava pelos filtros bacterianos descritos por CHAMBERLAND em 1884. Este grupo introduziu o uso destes filtros para separar o agente da pleuropneumonia, de crescimento lento, dos outros microrganismos contaminantes, de crescimento rápido, como *Pneumobacillus liquefaciens bovis*, freqüentemente encontrado nos pulmões dos animais. A técnica de filtração tem sido utilizada desde então, para o isolamento dos micoplasmas.

Apesar desta diferença básica entre os microrganismos filtráveis cultiváveis em meios artificiais (micoplasmas) e não cultiváveis (vírus), os micoplasmas foram freqüentemente confundidos com os vírus, na concepção moderna do termo, durante os anos seguintes.

Não obstante as dificuldades na caracterização do microrganismo por sua extrema tenuidade, a morfologia do agente da pleuropneumonia foi ainda estudada por alguns autores, como BORDET em 1910. Ele descreveu-o como um organismo altamente polimórfico, com uma forma filamentosa semelhante a um micélio, algumas vezes dividido, propondo a denominação *Asterococcus mycoïdes*. Outros nomes foram sugeridos por vários autores, sendo o termo micoplasma utilizado pela primeira vez por NOWAK, em 1929, sugerindo o nome *Mycoplasma peripneumoniae* para o agente da pleuropneumonia bovina.

Na década de 50 a situação foi reexaminada por EDWARD (1955) e EDWARD & FREUNDT (1956), que propuseram o nome *Mycoplasma mycoïdes* para o agente em questão. *Mycoplasma* se tornou o nome legítimo do gênero, e *mycoïdes* o nome legítimo da espécie, por ter sido o primeiro proposto.

1.2.- RECONHECIMENTO DA EXISTÊNCIA DE OUTRAS ESPÉCIES DE MICOPLASMAS:

Em 1925, BRIDÉ & DONATIEN cultivaram, de ovelhas afetadas por uma agalactia contagiosa, um microrganismo hoje conhecido como *Mycoplasma agalactiae*, muito semelhante ao agente da pleuropneumonia do gado. Mais tarde, microrganismos semelhantes foram isolados de cães no Japão (1934) e de camundongos e ratos na América e Inglaterra (1938-1940). Ficava então evidente que havia um grupo de microrganismos semelhantes ao da pleuropneumonia bovina.

SABIN, (1941) foi um dos primeiros autores a rever "os microrganismos filtráveis do grupo da pleuropneumonia", e a fazer uma tentativa para uma classificação e nomenclatura racional e compreensível.

Por muitos anos o nome PPLO ("Pleuropneumonia-like organisms") foi utilizado para designar os organismos deste grupo. Quando o nome genérico *Mycoplasma* foi legitimado, o nome trivial micoplasma substituiu progressivamente a denominação PPLO.

O termo *Mollicutes* foi proposto em 1967 como nome da classe estabelecida para a ordem *Mycoplasmatales* (EDWARD & FREUND, 1967). O nome genérico mollicutes abrange todos os microrganismos pertencentes à classe, ficando a denominação micoplasmas relativa aos microrganismos do gênero *Mycoplasma*, apesar de ser freqüentemente utilizada como referência à todas as mais de 150 espécies descritas.

De acordo com a classificação de BEHBAHANI et al. (1993), os mollicutes estão filogeneticamente relacionados com as bactérias Gram positivas. Por análise comparada da seqüência de seu rRNA 16S, os mollicutes estão atualmente divididos em cinco grupos: Hominis, Pneumoniae, Spiroplasma, Anaeroplasma, e o último: Asteroleplasma, contendo somente a espécie tipo do grupo: *Asteroleplasma anaerobium* (fig. 1) (BEHBAHANI et al., 1993).

Figura 1. Dendrograma do rRNA 16S mostrando a relação de 26 espécies de mollicutes com 3 espécies de bactérias Gram positivas, *Clostridium innocuum*, *C. ramosum* e *Lactobacillus cateforme*, assinaladas na figura*.

1.3.- MOLICUTES QUE INFECTAM O HOMEM:

Mycoplasma hominis

O primeiro isolamento de um molicute no homem foi relatado em 1937 por DIENES & EDSALL. Agora conhecido como *Mycoplasma hominis*, o organismo foi cultivado a partir de um abscesso de glândula de Bartholin. Necessitava de soro para o crescimento e possuía características morfológicas e de cultura semelhantes aos molicutes isolados de animais. Atualmente está bem estabelecido seu papel na etiologia das vaginoses bacterianas, sendo detectado na vagina de cerca de dois terços ou mais de mulheres com sintomas, e somente em 10% de mulheres assintomáticas (TAYLOR-ROBINSON, 1996a). Existem também evidências do envolvimento de *M. hominis* na doença pélvica inflamatória (PID), tendo sido isolado de cerca de 10% de mulheres com salpingite diagnosticada por laparoscopia. Seu papel etiológico nestas patologias é sustentado pela presença de anticorpos específicos no soro, apesar de ser incerta a exata proporção de casos decorrentes da doença tubária. (TAYLOR-ROBINSON, 1996a). De fato, há evidências de seu potencial na etiologia destas doenças, uma vez que anticorpos anti- *M. hominis* são encontrados três vezes mais freqüentemente em mulheres inférteis que tiveram PID, quando comparado ao grupo controle (MOLLER et al., 1985). O microrganismo foi também isolado do líquido amniótico de mulheres que em seguida entraram em trabalho de parto prematuro (CASSEL et al., 1983). Tem sido isolado também de maneira significativa, mais freqüentemente do trato genital inferior de gestantes que tiveram parto prematuro em relação à gestantes com parto no tempo normal (LAMONT et al., 1987). Calcula-se que mulheres com vaginose bacteriana apresentem cinco vezes mais risco de terem parto prematuro, em relação às não infectadas (HAY et al., 1994). *M. hominis* foi também isolado do sangue de cerca de 10% de mulheres que tiveram febre puerperal ou febre pós-aborto mas, não de mulheres afebris que tiveram aborto ou de gestantes saudáveis. Além disso, anticorpos são detectados em cerca de 50% de mulheres que ficaram febris, comparado à muito

poucas que permaneceram afebris (TAYLOR-ROBINSON & MUNDAY, 1988). Estas evidências indicam que *M. hominis* é um dos agentes responsáveis por casos de febre puerperal e febre pós-aborto (TAYLOR-ROBINSON, 1997). Além disso, existem alguns relatos onde *M. hominis* é responsável por causar doenças no trato respiratório de recém nascidos, podendo inclusive infectar o sistema nervoso central, causando meningite, sendo detectado no líquido cefalo-raquidiano (TAYLOR-ROBINSON, 1996a).

Mycoplasma pneumoniae

No início da década de 40, foram notados vários casos de pneumonia atípica primária - PAP (atípica por ter imagem distinta da pneumonia lobar característica, e não responder à penicilina), acometendo adultos jovens em universidades e quartéis nos Estados Unidos. EATON et al. estudaram a etiologia da PAP, e encontraram associação da doença com um agente filtrável, que ficou conhecido como o agente de Eaton (EATON et al., 1944). Considerado por muitos anos como sendo um vírus por sua filtrabilidade, apesar de ser inibido por uma ampla gama de antibióticos, exceto a penicilina, o agente de Eaton foi finalmente identificado como um mollicute por CHANOCK et al., em 1962. O microrganismo foi denominado *Mycoplasma pneumoniae* pelo mesmo grupo em 1963 (CHANOCK et al., 1963), sendo o primeiro mollicute comprovado como patógeno humano primário. É reconhecido atualmente como responsável por cerca de 15 à 20% dos casos de pneumonia, podendo chegar à 40% em certos grupos confinados, como recrutas em quartéis (FOY, 1993). Apesar de raramente ter sido isolado do trato genital inferior de mulheres (GOULET et al., 1995), alguns investigadores afirmam que *M. pneumoniae* também exista no trato genital superior, causando inclusive abscessos tubo-ovarianos (TAYLOR-ROBINSON, 1996a). Entretanto, estas observações necessitam ser melhor estudadas.

Ureaplasma urealyticum

Em 1954, SHEPARD isolou um microrganismo do trato urogenital de homens com uretrite não-gonocócica primária e recorrente. Apesar de possuir as mesmas necessidades nutricionais, tinha características diferentes dos micoplasmas isolados até então de homens e animais. Produzia colônias muito pequenas, sendo então chamado de cepa T ou "T-strain" (T de "tiny", pequeno). Não fermentava carboidratos e necessitava uréia para crescer. Estas propriedades diferenciavam o novo organismo das espécies de *Mycoplasma* até então conhecidas e levaram, em 1974, ao estabelecimento do novo gênero *Ureaplasma* e da nova espécie *U. urealyticum* (SHEPARD et al., 1974). Várias espécies de ureaplasmas tem sido descritas desde então, isolados principalmente de animais. A patogenicidade de *U. urealyticum* para o trato urogenital humano foi estabelecida e o postulado de Koch comprovado por inoculação experimental em dois voluntários humanos (TAYLOR-ROBINSON, et al., 1977). Era então o segundo membro dos mollicutes reconhecido como patógeno humano. Entretanto, a exata proporção de indivíduos que tem doença induzida por *U. urealyticum* ainda não está bem estabelecida. Sua presença em indivíduos assintomáticos, além das diferenças antigênicas observadas intra-espécie, levantam a suspeita de uma variação de patogenicidade entre seus 14 sorotipos (CUNHA et al., 1997), os quais foram divididos em dois grupos: A e B, e assim distribuídos: grupo A: II, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI e XII, e grupo B: I, III, VI, XIII e XIV. Um potencial patogênico maior vem sendo atribuído aos membros do grupo B, entretanto, estas observações necessitam de mais estudos. Depois de *C. trachomatis* e *Mycoplasma genitalium*, é considerado a terceira maior causa das uretrites não- gonocócicas (TAYLOR-ROBINSON, 1996a). O papel de *U. urealyticum* na etiologia de algumas complicações da gravidez é bastante sugestivo, por ter sido isolado, assim como *M. hominis*, do líquido amniótico de gestantes com corioamnionite severa que tiveram parto prematuro (CASSEL et al., 1983). Foi também mais freqüentemente isolado, inclusive de órgãos internos, de fetos abortados espontaneamente e crianças prematuras do que

de fetos com aborto induzido ou crianças saudáveis nascidas a termo, não sendo portanto resultado de contaminação superficial na passagem pelo canal vaginal (TAYLOR-ROBINSON & MUNDAY, 1988). Entretanto, estes estudos não deixaram claro se a infecção por *U. urealyticum* tem um papel na indução do aborto além da influência da vaginose bacteriana. Outra complicação da gravidez, com a transmissão do microrganismo à criança, é a produção de quadros de displasia broncopulmonar no neonato (ALFA, 1995). Seu envolvimento nestes casos é embasado no fato de ter sido isolado a partir dos pulmões fetais, na ausência de outros patógenos, bem como na detecção de resposta específica de anticorpos anti- *U. urealyticum* no soro de neonatos acometidos por esta doença (BRUS et al., 1991, QUINN et al., 1983). Além do processo séptico relatado por BRUS et al. (1991), o microrganismo pode inclusive infectar o Sistema Nervoso Central do recém-nascido, causando meningite (HEGGIE, 1994).

U. urealyticum tem ainda envolvimento em epididimites, cálculos renais infecciosos, febre puerperal, artrite reativa sexualmente adquirida (Síndrome de Reiter) e artrite em indivíduos hipogamaglobulinêmicos (TAYLOR-ROBINSON, 1997).

Mycoplasma fermentans

Mycoplasma fermentans foi isolado, pela primeira vez, do trato urogenital humano, no início da década de 50 (RUITER & WENTHOLT, 1952), tendo sido considerado infreqüente neste sítio. Foi o primeiro mollicute relatado como invasivo em indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), tendo sido isolado da urina de um destes indivíduos por LO et al. (1989a), o qual, apesar de micoplasmologista, pensou tratar-se de um vírus. Posteriormente este autor identificou-o como sendo um mollicute, classificando-o como espécie *incognitus* do gênero *Mycoplasma* (LO et al., 1989b). Outros autores confirmaram a suspeita de que o achado de LO seria de uma cepa de *Mycoplasma fermentans*, ficando a denominação de cepa ou variedade *incognitus* (SAILLARD et al, 1990,

SASAKI et al, 1992). Outros isolamentos de indivíduos HIV positivos se sucederam, tais como de células mononucleares do sangue periférico (LEMAÎTRE et al., 1992) e da urina de outros dois indivíduos, de um total de 43, sendo que destes, sete apresentavam PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) positiva para este mollicute (DAWSON et al., 1993). Estes achados, junto com a observação de que *M. fermentans* e outros mollicutes podem estimular a replicação do HIV *in vitro* (CHOWDHURY et al., 1990), levaram pela primeira vez à hipótese de que estes microrganismos poderiam ter um papel no desenvolvimento da AIDS (MONTAGNIER & BLANCHARD, 1993).

Com o uso da tecnologia da PCR, *M. fermentans* tem sido detectado na urina de homossexuais masculinos infectados pelo HIV, em células mononucleares do sangue periférico e traquéia em taxas de 5, 10 e 20%, respectivamente. As mesmas proporções foram porém encontradas em indivíduos HIV-negativos, sendo a maioria deles homossexuais (KATSENI et al., 1993). Assim, a importância de *M. fermentans* como co-fator do HIV permanece dúbia, aliada ao fato de não haver diferenças quanto à sua detecção em indivíduos com AIDS em diferentes estádios da doença (TAYLOR-ROBINSON, 1996a).

M. fermentans foi isolado da traquéia de cerca de 16% de crianças com pneumonia, sendo em dois terços destas o único microrganismo presente (CASSEL, et al., 1994). Foi detectado também em alguns adultos com uma doença semelhante à influenza, que em alguns casos progrediu rapidamente, evoluindo para uma síndrome respiratória freqüentemente fatal (LO et al., 1993). Entretanto, *M. fermentans* foi detectado, pela técnica de PCR, na traquéia e urina de cerca de 20% de estudantes de medicina saudáveis, levantando a questão de qual seria seu sítio preferencial de colonização e sua importância na etiologia de doenças (TAYLOR-ROBINSON, 1997). Além disso, até o momento, não existem evidências de que *M. fermentans* seja uma das causas de uretrite não-gonocócica em homens, ou de doença do trato urogenital de mulheres (DEGUCHI et al., 1996). Há, no entanto, suspeitas de que em condições de imunodepressão, venha a agir como um patógeno oportunista, pois foi

detectado, pela técnica da PCR, em amostras de lavado broncoalveolar de 25% dos indivíduos com AIDS apresentando pneumonia, o que não ocorreu em indivíduos HIV-negativos (AINSWORTH et al., 1994). Mais recentemente foi detectado, também por PCR, nas articulações de cerca de 20% de indivíduos com artrite reumatóide e outras condições inflamatórias, porém seu papel nestes processos necessita ainda de maiores investigações (SCHAEVERBEKE et al., 1996).

A falta de consenso sobre o papel de *M. fermentans* em doenças demonstra a complexidade do comportamento deste agente, e requer ainda muitos estudos para a elucidação definitiva de sua real patogenicidade, que até hoje continua sendo um paradoxo.

Mycoplasma genitalium

Após o primeiro relato de cultivo e isolamento de *Mycoplasma genitalium*, de amostras uretrais de dois entre 13 homens com uretrite não-gonocócica aguda (TULLY et al., 1981), varias tentativas de repetição desta observação terminaram em insucesso. Vários pesquisadores tentaram desenvolver sondas de DNA, mas esta técnica foi superada pela maior sensibilidade da técnica de PCR (TAYLOR-ROBINSON, 1995). A disponibilidade deste teste trouxe a possibilidade de reavaliar a representatividade de *M. genitalium* sob vários aspectos, inclusive quanto a sua participação em uretrites não-gonocócicas. Este mollicute tem sido detectado mais freqüentemente em amostras uretrais de homens com uretrite não-gonocócica, do que em amostras de homens sem esta condição (TAYLOR-ROBINSON, 1997). E ainda, anticorpos anti- *M. genitalium* foram mais freqüentemente detectados, por testes imunoenzimáticos, no soro de homens que tiveram PCR positiva para *M. genitalium* do que no soro de homens que tiveram PCR negativa (TAYLOR-ROBINSON, 1997). Recentemente, *M. genitalium* foi isolado de homens com uretrite não-gonocócica através do cultivo em meio para mollicutes, utilizando-se culturas de células como passagem intermediária (JENSEN et al, 1996).

Estes achados sugerem que o microrganismo está fortemente associado a uretrite não-gonocócica aguda. Além disso foi detectado, pela técnica da PCR, na uretra de cerca de 20% de homens com doença persistente ou recorrente, seguida de uma agudização do quadro (TAYLOR-ROBINSON, 1993, 1995, 1997). No último estudo, segundo o autor, ficou claro que o microrganismo tinha persistido desde o episódio inicial de uretrite, até a cronificação da doença, mesmo sob terapia com antibiótico. O autor sugere, em outras palavras, que o microrganismo pode persistir no trato urogenital da mesma maneira que *M. pneumoniae* persiste no trato respiratório, mesmo frente à doses adequadas de antibiótico, às quais os microrganismos são sensíveis *in vitro*.

Em mulheres, *M. genitalium* não parece estar associado a vaginose bacteriana. Entretanto foi detectado, pela técnica de PCR, no trato genital inferior em 7-20% de mulheres sob tratamento em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (TAYLOR-ROBINSON, 1995). O autor sugere seu envolvimento em doenças do trato genital superior, baseado no fato de que, *in vitro*, o microrganismo adere a células epiteliais das trompas de Falópio e um aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpos anti- *M. genitalium*, determinado por técnica de imunofluorescência, foi detectado em cerca de um terço de mulheres com doença pélvica inflamatória sem evidências de infecção por gonococo, clamídia ou *M. hominis* (MOLLER, 1984). Entretanto, outros autores discordam desta observação, não encontrando significância nos títulos de anticorpos anti- *M. genitalium* em mulheres com doença pélvica inflamatória (LIND, 1987).

Após o isolamento de *M. genitalium* de amostras uretrais de homens, este microrganismo foi detectado em várias amostras do trato respiratório. Em 1968, 16 amostras de fuzileiros navais americanos positivas para *M. pneumoniae*, foram armazenadas à -70 °C; 18 anos depois, foi observado que quatro continham também *M. genitalium* (BASEMAN et al., 1988). As evidências atuais indicam que este microrganismo é encontrado muito mais freqüentemente no trato urogenital que no respiratório. Entretanto, por sua conhecida patogenicidade, o potencial de *M. genitalium* de causar doenças respiratórias deve ser considerado, podendo inclusive

estar sendo subestimado, pela semelhança antigênica que possui com *M. pneumoniae*, o que pode dificultar a avaliação dos testes sorológicos no diagnóstico de infecções por estas espécies (TAYLOR-ROBINSON, 1996a).

Mycoplasma penetrans

Mycoplasma penetrans é a mais nova espécie de mollicute identificada infectando o homem. Foi isolada em 1991, de amostras de urina de seis indivíduos com AIDS, não sendo, porém, encontrada em 98 indivíduos HIV-negativos (LO et al., 1991). Nesse trabalho, o autor chamou o novo microrganismo de cepa GTU-54 e no ano seguinte, com a colaboração de TULLY, renomado micoplasmologista, propuseram a caracterização de uma nova espécie do gênero *Mycoplasma*, denominando o novo isolado de *M. penetrans* (LO et al., 1992). Sua morfologia celular foi descrita como sendo em forma de garrafa, tendo dois compartimentos distintos, um na porção terminal mais afilada, contendo finos grânulos densamente compactados, e outro na porção mais larga do corpo da célula, contendo grânulos mais esparsos (fig. 2) (LO et al., 1992). Como propriedades biológicas e bioquímicas, o novo micoplasma possui morfologia colonial típica do gênero (fig. 3), é capaz de fermentar e oxidar a glicose, de hidrolisar arginina, necessita de colesterol para seu crescimento, é susceptível à digitonina, possui atividade de fosfatase, tem propriedade de redução do tetrazólio, adesão à superfícies de plástico e vidro, hemadsorção, citoadsorção, formação de beta-hemólise, fraca alfa-hemólise, é incapaz de hidrolisar uréia, e tem conteúdo G+C de 30,5% (LO et al., 1992). Os autores demonstraram também que *M. penetrans* é capaz de aderir e invadir várias células de mamíferos, processo que é mediado pela porção terminal mais afilada de sua célula (LO et al., 1992). Desta propriedade resultou a sugestão de sua denominação. Este é um importante fator de virulência para muitos microrganismos, encontrado até então em somente uma espécie de mollicute: *M. fermentans* (LO et al., 1989b). Mais recentemente, NEYROLLES et al. (1998) demonstraram que a célula de *M.*

penetrans é envolvida por uma cápsula de composição polissacarídica (fig. 4), que parece mediar o processo de adesão à outras células, e pode ainda ser um importante fator na evasão da resposta imune do hospedeiro.

Figura 2. Microscopia eletrônica de célula de *M. penetrans*, mostrando a parte terminal mais afilada, com grânulos compactados, e a porção mais larga do corpo da célula, com grânulos mais esparsos. A seta indica a estrutura responsável por sua adesão. (Foto gentilmente cedida por Dr. Alain Blanchard, Pasteur Institute, Paris).

Figura 3. Colônias de *M. penetrans* em meio sólido SP-4, cepa GTU-546A1, observadas em aumento de 40x.

Figura 4. Microscopia eletrônica de célula de *M. penetrans* corada com vermelho de rutênio (foto gentilmente cedida por Dr. Alain Blanchard, Pasteur Institute, Paris). → Cápsula polissacarídica.

Além do fato de ter sido isolado somente de indivíduos com AIDS, *M. penetrans* parece estar sorologicamente associado a este grupo. Devido à uma maior prevalência de anticorpos específicos nestes indivíduos, de 20 à 40%, WANG et al., (1992), sugeriram haver uma forte associação entre AIDS e *M. penetrans*. Esses dados foram motivo de críticas, pois a orientação sexual dos indivíduos testados não foi avaliada, havendo a especulação de que o microrganismo talvez estivesse associado somente à homossexualidade, sendo residente da flora intestinal (TAYLOR-ROBINSON & AINSWORTH, 1993). Em resposta, os autores relataram que a pesquisa do agente no trato digestivo masculino foi negativa (WANG et al., 1993). Neste mesmo estudo, os autores tentaram encontrar uma associação de *M. penetrans* com indivíduos com AIDS acometidos de Sarcoma de Kaposi, sendo que 59,6% destes apresentavam anticorpos anti- *M. penetrans* (WANG et al., 1993). Entretanto, outros autores não encontraram esta associação (GRAU et al., 1995), e a detecção de um novo herpes vírus,

HHV8, em todas as lesões de Sarcoma de Kaposi testadas, mudaram o ponto de vista da gênese da doença (CHANG et al., 1994, WHITHBY et al., 1995). A hipótese de que *M. penetrans* possa contribuir ou facilitar o desenvolvimento do Sarcoma de Kaposi permanece não esclarecida.

Os estudos realizados até então demonstravam uma prevalência de anticorpos anti- *M. penetrans* no soro de indivíduos HIV-positivos de 3,8-40%, sendo maior em aidéticos homossexuais, em relação à taxas de 0,3-15,5% no soro de indivíduos HIV-negativos (WANG et al., 1992, GRAU et al., 1995, TUPPIN et al., 1997). Os trabalhos de GRAU et al. (1995) sugerem ainda que os resultados obtidos por ELISA deveriam ser confirmados por imunoblot, para observar a reação com o peptídeo de 38 kD, que segundo os autores, é específico para *M. penetrans*.

A técnica da PCR para *M. penetrans* foi utilizada pela primeira vez por GRAU et al., (1994). No nosso meio, CUNHA et al., (1998), em um estudo preliminar, porém pioneiro, demonstraram a positividade da PCR para *M. penetrans* em 8% das amostras de raspado uretral, tanto de indivíduos HIV- positivos quanto negativos no Estado de São Paulo.

Raríssimas tentativas posteriores aos primeiros isolamentos de *M. penetrans* têm tido sucesso, existindo até o momento apenas 5 cepas isoladas no mundo, incluindo a originalmente caracterizada por LO et al., (1991) (Dr. Alan Blanchard, comunicação pessoal).

Este agente, aparentemente não causa infecções sistêmicas, pois não tem sido detectado no sangue periférico de indivíduos aidéticos testados (KOVACIC et al., 1996), mas é o mais forte candidato dos micoplasmas ao eventual papel de co-fator do HIV no desenvolvimento da AIDS. Além disso, vários estudos *in vitro* têm avaliado seu potencial patogênico. SASAKI et al. (1995) relataram que *M. penetrans* tem a propriedade de induzir *in vitro* uma resposta proliferativa de células T CD4 e CD8, com expressão de alguns marcadores de ativação, como CD69, HLA-DR e CD 25, tanto em células de indivíduos HIV-positivos em vários estágios da doença, quanto de HIV-negativos. Este achado pode ter impacto no fato de que o HIV só se replica completamente em células ativadas (MONTAGNIER & BLANCHARD, 1993). Outro achado interessante foi de

que, principalmente componentes de membrana de *M. penetrans* e *M. fermentans*, podem ativar *in vitro* a expressão gênica do HIV dependente da região LTR (NIR-PAZ et al., 1995). Os autores ainda sugerem ser esta ativação devida ao acúmulo de radicais livres de oxigênio após a infecção pelos micoplasmas, uma vez que já foi demonstrado que tal fato resulta na elevação de NF- κ B, conhecido ativador do HIV pela região LTR (GAYNOR, 1992). Outro estudo mostrou também a capacidade de *M. penetrans* induzir a produção de TNF α e a replicação do HIV em linhagens celulares, atividade provavelmente devida à carboidratos presentes em extratos de membrana do microrganismo (IYAMA et al., 1996).

Poder-se-ia argumentar que, pelo ponto de vista apresentado, qualquer agente infeccioso com propriedade de ativar cronicamente o sistema imune poderia ter um papel de co-fator do HIV, assim como micobactérias, salmonela, leishmania, toxoplasma, citomegalovírus, herpesvírus, Epstein-Barr vírus, HTLV-1/2 e outros retrovírus (BLANCHARD, 1997). Entretanto, pela cronicidade de sua infecção, pela associação de sua maior soroprevalência em indivíduos com AIDS, e pelos estudos de suas propriedades *in vitro*, os micoplasmas, especialmente *M. penetrans*, parecem ser os microrganismos que tem um maior potencial para representar o papel de eventual co-fator do HIV no desenvolvimento da AIDS (BRENNER et al., 1996).

Até o momento, a literatura relata poucos trabalhos conclusivos e de consenso, principalmente para algumas espécies de micoplasmas, como *M. penetrans*. As técnicas laboratoriais para o estudo dos micoplasmas são em geral bastante complexas, e os resultados são de difícil interpretação. No entanto, sua importância é indiscutível, estando associados à um grande número de doenças, onde pode ser encontrado como único agente ou associado à outros patógenos.

Várias técnicas estão disponíveis para a detecção e caracterização dos micoplasmas, como o uso de sondas ou amplificação do DNA, além de várias metodologias imunológicas e de cultivo com meios enriquecidos que têm possibilitado inclusive o isolamento de espécies de crescimento mais difícil (TAYLOR-ROBINSON, 1996b). Entretanto, na

imensa maioria dos laboratórios de rotina, os procedimentos resumem-se a testes imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos anti- *M. pneumoniae* e cultura para espécies que infectam o trato urogenital, muitas vezes com a utilização de kits comerciais, o que definitivamente restringe o diagnóstico à detecção das espécies *M. hominis* e *U. urealyticum*. As técnicas moleculares, como a PCR, ainda são pouco utilizadas na rotina. Estes fatores vêm dificultando o reconhecimento de que outras espécies com potencial patogênico importante para o homem possam estar infectando indivíduos de nossa população.

Por estas razões, propusemos um estudo sobre a detecção das espécies de mollicutes de maior relevância no trato urogenital, em indivíduos HIV-positivos e HIV- negativos com DST, por várias metodologias e utilizando diferentes materiais clínicos, procurando demonstrar a participação tanto de espécies emergentes quanto das demais, já consagradas como de importância clínica indiscutível.

2.- OBJETIVOS

Com a finalidade de determinar, no Estado de São Paulo, Brasil, a prevalência dos principais mollicutes encontrados no trato urogenital de indivíduos HIV-positivos, fazendo um estudo paralelo com um grupo de indivíduos HIV-negativos com queixa clínica de uretrite, foram objetivos de nosso estudo:

- Investigar a presença de mollicutes em amostras de urina e raspado uretral, por metodologias de cultivo e PCR;
- Determinar a prevalência das espécies emergentes de micoplasmas, avaliando-a simultaneamente com as espécies de etiologia comprovada em doenças do trato urogenital, como *U. urealyticum* e *M. hominis*, nos dois grupos de pacientes estudados;
- Classificar os isolados de *U. urealyticum* quanto aos diferentes graus de patogenicidade, em um dos dois grupos: A e B;
- Optimizar a técnica de ELISA para a determinar a prevalência de anticorpos séricos das classes IgG, IgM e IgA anti- *M. penetrans* nos indivíduos estudados;
- Determinar a soro-reatividade dos indivíduos HIV-positivos e negativos quanto a proteína de 38 kD de *M. penetrans* por Immunoblot.
- Verificar a especificidade da proteína de 38 kD frente a soros de indivíduos infectados por *M. hominis*, *M. pneumoniae* e *U. urealyticum*.

MATERIAL E MÉTODOS

3.- MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa dos micoplasmas nas diferentes amostras clínicas, dos indivíduos dos dois grupos estudados, obedeceu o seguinte fluxograma:

3.1.- Pacientes:

Com a finalidade de determinar a prevalência dos micoplasmas com relevância em infecções do trato urogenital em indivíduos de nosso meio, foram estudadas amostras obtidas de homens adultos, na faixa etária de 18 à 61 anos.

Grupos de estudo: foi realizada a coleta de amostras de 106 indivíduos HIV-1 positivos, procedentes do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, mediante termo de consentimento pós-informado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética daquela instituição.

Grupo de indivíduos HIV- negativos com queixa clínica de uretrite (grupo DST): foram coletadas amostras de 110 pacientes, procedentes do Hospital da Polícia Militar do Estado de São Paulo.

3.2.- Amostras:

Para o isolamento dos mollicutes encontrados no trato urogenital, e sua detecção pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram obtidas amostras de raspado uretral e de primeiro jato urinário de 106 indivíduos do grupo HIV-positivo, e de 110 do grupo DST, totalizando 212 e 220 amostras do trato geniturinário, respectivamente.

Para pesquisa de anticorpos séricos anti-*M. penetrans* por ELISA e Immunoblot, foram coletados cerca de 10 mL de sangue de cada indivíduo, dos dois grupos.

3.3.- Diagnóstico da infecção pelo HIV-1:

O diagnóstico clínico da infecção pelo HIV-1 dos pacientes provenientes no Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, foi realizado pelo Serviço de Moléstias Infecciosas do hospital. O

diagnóstico laboratorial foi feito pelo Serviço de Laboratório Clínico, através dos seguintes testes: ELISA HIV-1+2 (Abbott Lab., USA), Aglutinação de partículas de gelatina para HIV-1 (PA), (Serodia, Fujirebio, Japão), e Western Blot anti- HIV-1 (Cambridge Biotech, USA), obedecendo a metodologia e os critérios de interpretação dos resultados segundo os fabricantes.

3.4.- Avaliação da relação das células CD4 e CD8+ no sangue dos indivíduos infectados pelo HIV:

A quantificação das células CD4 e CD8+ dos indivíduos infectados pelo HIV-1 foi feita pelo Serviço de Laboratório Clínico do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, utilizando citômetro de fluxo (Ortho ImmunoCount Flow Cytometer System, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA), e anticorpos monoclonais com marcação tripla: CD4/CD8/CD3 (Ortho Trio Monoclonal Antibodies, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA).

Dos 106 indivíduos HIV- positivos estudados, de 53 (50%) foi possível obter os resultados da contagem das células CD4 e CD8. Destes, 30/50 (60%) apresentavam relação CD4:CD8 menor que 0,3.

3.5.- Processamento das amostras:

3.5.1.- Raspados uretrais:

Os raspados uretrais, imediatamente após a coleta, foram mantidos em tubos com 3 mL de meio de transporte A_{3XB}, a 4°C. A seguir, 1,6 mL das amostras foram processadas para cultura, e 1,0 mL armazenado a -20 °C, para quantificação dos casos positivos, e tratamento para PCR. Os 0,4 mL restantes foram armazenados a -80 °C.

3.5.2.- Urina:

Cerca de 20 ml do primeiro jato urinário de cada indivíduo foram centrifugados a 2.000 g por 20 minutos a 4°C, e o sedimento ressuspensão em 3 mL de meio de transporte A_{3XB}. A seguir, as amostras foram submetidas ao cultivo, e 1,0 mL armazenado a -20 °C, para testes pela reação da PCR. O restante foi armazenados a -80 °C.

3.5.3.- Soro:

As amostras de sangue foram incubadas a 37 °C por 30 minutos para completa coagulação, e centrifugadas em seguida a 1.500 g por 5 minutos. O soro foi separado e armazenado em tubos a -20°C.

3.6.- Cultura de micoplasmas:

Para o isolamento dos micoplasmas mais comuns, 0,5 mL de cada amostra de raspado uretral e primeiro jato urinário, mantidas em meio de transporte A_{3XB}, foram inoculados em 2,0 mL dos meios líquidos U₁₀, para *U. urealyticum*, e Arginina, para *M. hominis*.

Para o isolamento das espécies de crescimento mais difícil, 0,5 mL de cada amostra de raspado uretral e de primeiro jato urinário, mantidas em meio de transporte A_{3XB}, foram inoculados em 2,0 mL de meio SP-4 . Destes tubos, 0,2 mL foram passados para novo tubo com 1,8 mL de meio, e assim uma vez mais, resultando em cultura das amostras diluídas à 1:5, 1:50 e 1:500 nos respectivos meios. Estas diluições tiveram como objetivo diminuir a concentração de inibidores do crescimento dos micoplasmas que poderiam estar presentes, como por exemplo anticorpos e antibióticos (TAYLOR-ROBINSON, 1996a).

Foram também inoculados 0,1 mL de cada amostra de raspado uretral e primeiro jato urinário em meio sólido A₇, para a observação

do aparecimento de colônias. As amostras inoculadas nos meios U₁₀, Arginina e A₇ foram incubadas em condições de 2-3 % de CO₂ (jarra de vela) e as inoculadas em meio SP-4 foram incubadas em aerobiose, por até 15 dias, a 37 °C. Os tubos com amostras inoculadas em meio SP-4, após 7 dias, foram repicados, adicionando-se 1 mL da cultura em 2 mL de meio SP-4. Estes repiques cegos foram realizados ao menos 3 vezes, na tentativa de isolar espécies de crescimento mais difícil (TAYLOR-ROBINSON, 1996b).

3.7.- Quantificação dos isolados positivos para *U. urealyticum* e *M. hominis*:

A quantificação de *M. hominis* e *U. urealyticum* presentes nas amostras de raspado uretral, detectados por cultura, foi feita pela técnica de microtitulação, uma vez que esta metodologia já está bem padronizada para estas espécies (TAYLOR-ROBINSON, 1996b). Em uma placa plástica estéril de 96 cavidades, foram cultivados 30 µL da amostra mantida no meio de transporte, realizando-se diluições seriadas de razão 10, a partir de 10⁻¹, em 270 µL de meio, quer sejam, U₁₀ para *Ureaplasma urealyticum*, ou Arginina para *Mycoplasma hominis*. A maior diluição com mudança de indicador do meio representa o número de microrganismos presente na amostra, sendo expresso em CCU (*Color Changing Units*) por mL.

3.8.- Identificação dos isolados através do cultivo e da sorologia:

As cepas de *Ureaplasma urealyticum* isoladas foram identificadas por sua morfologia colonial típica no meio sólido A₇, onde a colônia adquire coloração marrom-dourado, resultante da reação de seus metabólitos com o MnSO₄ adicionado à formulação do meio. A identificação desta espécie foi também realizada pela observação da alcalinização do pH do meio líquido U₁₀, decorrente da ação da enzima urease, que degrada a uréia presente no meio em amônia (TAYLOR-ROBINSON, 1996b).

As cepas de *Mycoplasma hominis* isoladas foram presuntivamente identificadas pela morfologia colonial característica do gênero no meio sólido A₇. A definição da espécie foi confirmada com soro hiperimune de coelho pela técnica de imunodifusão dupla de Ouchterlony (TAYLOR-ROBINSON, 1996b), e pela técnica de PCR a partir dos isolados cultivados em meio de Arginina.

3.8.1.- Imunodifusão dupla de Ouchterlony para *M. hominis*:

Lâminas de microscopia foram preparadas para imunodifusão sendo cobertas com 1 mL de ágar à 1% em água destilada, e secas em estufa a 37°C por 24 horas. Em seguida foram recobertas com 3 mL de ágar à 1% em solução fisiológica adicionada de timerosal 1/10000. Após sua solidificação, foram feitos 7 orifícios, um no centro e 6 ao redor. No centro foi colocado 25µL de soro hiperimune anti-*M. hominis* obtido de coelho, e nos demais o antígeno preparado como segue: 1 mL de cada cultura de *Mycoplasma spp.* em meio de Arginina foi centrifugado a 13.000g por 30 minutos, e ressuspenso em 25µL de solução salina. Este volume foi aplicado nos orifícios laterais, e a lâmina foi incubada a temperatura ambiente em câmara úmida por 48 horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com solução fisiológica, realizando-se no mínimo 6 trocas, por 48 horas. Para secagem foram embrulhadas em papel de filtro umedecido, e colocadas em estufa a 45°C. Uma vez secas, as lâminas foram coradas com solução de Ponceau por 10 minutos. O excesso de corante foi retirado por lavagem com solução de ácido acético 5% (OUCHTERLONY, 1949).

3.8.2.- Obtenção de antígeno total de cepa padrão de *M. hominis* para imunização:

A cepa ATCC 23114 de *M. hominis* foi cultivada até fase exponencial de crescimento em 500 mL de meio de cultura de Arginina, sendo o soro de cavalo substituído pela fração de soro PPLO (Difco Lab., Detroit, Michigan, U.S.A.), para evitar a formação de anticorpos heterólogos,

contra proteínas do soro. A cultura foi centrifugada a 13.000 g por 1 hora, e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi homogeneizado com pipeta Pasteur, ressuspensão em 2 tubos com 40 ml de solução fisiológica estéril, seguido de nova centrifugação a 13.000 g por 1 hora. O sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspensão em 10 mL de PBS pH 7,4 com timerosal 0,025 %. Foi feita a dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinônico (Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce Inc, Illinois), e a concentração ajustada para cerca de 1,0 mg por mL. A preparação antigênica foi alíquotada, e armazenada a - 20 °C.

3.8.3- Obtenção de soro hiperimune de coelho:

A obtenção dos soros hiperimunes anti- *M. hominis* cepa ATCC 23114, e anti- *M. penetrans* cepa GTU-546A1, foi realizada na empresa Probac (São Paulo), de acordo com o protocolo de SENTERFIT (1983). Dois coelhos foram imunizados da seguinte maneira: 1,0 mg de antígeno total foi emulsificado com o mesmo volume de adjuvante completo de Freund, e aplicado em injeção subcutânea na região do gradil costal, onde um total de 6 pontos foram inoculados, sendo 3 de cada lado. Foram aplicados reforços com a mesma dose, sem adjuvante, no 14º, 28º e 56º dia. As sangrias foram feitas no tempo 0, 38º, 60º e 80º dia. O sangue foi incubado a 37°C por 30 minutos para completa coagulação, e centrifugado a 1.500 g por 5 minutos. O soro foi separado e armazenado em tubos a -20°C.

3.9.- Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação dos micoplasmas:

3.9.1.- Tratamento das amostras para PCR: extração do DNA com fenol/clorofórmio.

As amostras de urina e raspado uretral mantidos em meio de transporte A_{3XB} foram centrifugadas a 13.000 g por 15 minutos e o sedimento ressuspensão em 0,5 mL de tampão de lise (EDTA 1 mM, Tris-Cl

10 mM, Triton X-100 0,1 %, Proteinase K 200 µg/mL, pH = 8,0). A seguir, foram incubadas a 56 °C por 60 minutos e em seguida fervidas a 100 °C por 10 minutos para inativação da enzima Proteinase K. Foram adicionados 0,5 mL de fenol tamponado com Tris (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA), sendo a mistura submetida à emulsificação em agitador Vortex (FANEM, São Paulo), e posteriormente centrifugada à baixa rotação (1.000g) por 5 minutos. A fase orgânica foi desprezada, sendo adicionado 0,5 mL de uma mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1). A mistura foi emulsificada e centrifugada como anteriormente, e a fase aquosa transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 1,0 mL de etanol absoluto gelado e 50 µL de acetato de sódio 3 M. Após homogenização, as amostras foram mantidas a -20 °C ao menos por 1 hora para precipitação do DNA. A seguir, os tubos foram centrifugados a 13.000 g por 30 minutos, e o sedimento lavado em 1,0 mL de etanol a 70 %. O máximo de sobrenadante foi retirado, e os tubos foram deixados a temperatura ambiente para evaporar todo o álcool remanescente. O DNA foi dissolvido em 100 µL de tampão TE (EDTA 1 mM, Tris-Cl 10 mM, pH = 8,0), e mantido a -20 °C, segundo protocolo de BARBEYRAC (1996).

3.9.2.- Protocolo básico utilizado para a PCR:

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL. As amostras puras e também diluídas 10 vezes em água MilliQ® estéril foram amplificadas em tampão de reação Taq (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) uma vez concentrado, com 0,4µL de solução de nucleotídeos (dNTP, Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA, 25 mM cada), 1µL de solução de cada par de *primer* na concentração de uso, e 1 U de Taq DNA Polymerase (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

A amplificação foi realizada com uma denaturação inicial por 15 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos com denaturação por 30 segundos a 95 °C, pareamento dos primers por 1 minuto e 30 segundos a 58 °C, extensão por 1 minuto e 30 segundos a 72 °C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C.

3.9.3.- PCR para a detecção do gene da globina humana:

As amostras com cultura de micoplasmas positiva, porém com PCR negativa com os *primers* genéricos, foram testadas ainda quanto à presença de DNA na amostra, por detecção de gene da globina humana, verificando assim a eficácia do tratamento das mesmas pelo método empregado: 10 μ L das amostras puras e diluídas 10 vezes foram amplificadas com o uso dos seguintes *primers*, numa concentração de uso de 40 μ M:

- *primer sense*: 5'-CAA.CTT.CAT. CCA.CGT.TCA.CC-3'
- *primer anti-sense*: 5'-GAA.GAG.CCA.AGG.ACA.GGT.AC-3'

Este par de *primers* amplifica um fragmento resultando num produto de 141 bp.

3.9.4.- PCR Multiplex para a classe *Mollicutes*:

Dez μ L das amostras puras e também diluídas a 1: 10 em água destilada purificada (Milli Q®) autoclavada, com resultado de cultura positivo ou negativo, foram testadas por PCR para a detecção de micoplasmas presentes com um par de *primers* genéricos, MGSO e GPO₁, para toda a classe *Mollicutes*, em uma concentração de uso de 40 μ M (DUSSURGET et al., 1994). Foi utilizado um controle interno no tubo de reação, onde foi adicionado 2 fg de solução do plasmídeo pBr₃₂₂ (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, USA,), e seu respectivo par de *primers*, em uma concentração de uso de 40 μ M, para a observação da eventual presença de inibidores da reação na amostra. Os *primers* utilizados para os microrganismos da classe *Mollicutes* foram:

- *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'

Este par de *primers* amplifica um fragmento de 717 bp da região que codifica a porção 16S do rRNA (DUSSURGET et al., 1994).

Os *primers* utilizados para o plasmídeo pBr₃₂₂ foram:

- *primer sense*: 5'-CAT. CTC.GGG.CAG.CGT.TGG.GT-3'
- *primer anti-sense* 5'-AGC.GAC.GCG.AGT.CAG.TGA.GC-3'

Este par de *primers* amplifica um fragmento resultando num produto de 965 bp.

3.9.5.- PCR para identificação de *M. hominis*:

As amostra cujos tubos de cultura com meio líquido de Arginina sofreram mudança na cor do indicador, e tiveram crescimento de micoplasma com morfologia colonial típica do gênero por inoculação no meio sólido A₇, foram submetidas à identificação de *M. hominis* por PCR: 1 mL do meio líquido foi tratado para extração de DNA como descrito acima, e 2 µL foram utilizados para a amplificação.

A reação foi também realizada diretamente nas amostras de raspado uretral que tiveram cultura negativa, e de primeiro jato urinário, que tiveram PCR positiva com o uso de primers genéricos: 10 µL de cada amostra tratada foram utilizados para a amplificação.

Os *primers* utilizados para detecção de *M. hominis*, em um concentração de uso de 30 µM, amplificando um fragmento de 589 bp da região que codifica a porção 16S do rRNA (DUSSURGET et al., 1994), foram os seguintes:

- *primer sense*: 5'- TGA.AAG.GCG.CTG.TAA.GGC.GC -3'
- *primer anti-sense*: 5'- TAA.TCC.TGT.TTG.CTC.CCC.AC -3'

3.9.5.1.-Verificação da especificidade da PCR para *M. hominis*:

A especificidade da PCR para *M. hominis* foi verificada por análise dos padrões de restrição por digestão com a endonuclease Kpn I, resultando em um fragmento de 290 e outro de 299 bp : 25µL do produto amplificado das amostras positivas para *M. hominis* por PCR foram incubados a 37°C por 1 hora em tampão REact® 4 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA) uma vez concentrado, contendo 1µL de enzima Kpn I (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA), para 50µL de volume final, em H₂O MilliQ® autoclavada. Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com brometo de etídio, visualizado em transiluminador U.V.

3.9.6.- PCR para identificação de *U. urealyticum*:

As amostras que tiveram crescimento de colônias de *U. urealyticum* no meio sólido A₇, e mudança na cor do indicador do meio líquido U₁₀, foram também identificadas por PCR. Devido à existência de diferenças de patogenicidade entre os 14 sorotipos de *U. urealyticum*, os isolados foram distinguidos quanto ao sorogrupo ao qual pertencem. Um mL do meio líquido foi tratado para extração de DNA como descrito acima. As amostras foram submetidas à amplificação, primeiramente com um par de *primers* que detectam uma região que codifica a porção 16S do rRNA comum aos sorogrupos A e B, e em seguida, com outro par de *primers* que amplifica especificamente uma região do grupo B, em concentrações de uso de 30 µM (ROBERTSON et. al., 1993), utilizando 2 µL de cada amostra. Tal procedimento permitiu também demonstrar a especificidade da reação.

Foi feita também a pesquisa de *U. urealyticum* diretamente das amostras de raspado uretral e de primeiro jato urinário que tiveram cultura negativa, com PCR positiva, empregando os *primers* genéricos. Para tanto, foram utilizados 10 µL de cada amostra tratada, pura e diluída 10 vezes.

Como controle positivo foi utilizada a cepa ATCC 27618, classificada como sorotipo VIII, sorogrupo A. Como controle positivo da PCR para o sorogrupo B, foi utilizada uma cepa isolada em nosso laboratório. Os *primers* utilizados para detecção dos sorogrupos A + B, que originam um produto amplificado de 456 bp, foram os seguintes (BLANCHARD, 1990):

- *primer sense*: 5'- GAT. GGT.AAG.TTA.GTT.GCT.GAC -3'
- *primer anti-sense*: 5'- ACG.ACG.TCC.ATA.AGC.AAC.T -3'

Para a detecção do sorogrupo B, foram utilizados os seguintes *primers*, resultando um produto de 283 bp:

- *primer sense*: 5'- CAC.AGA.TGT.CCT.TGA.TGT.AC -3'
- *primer anti-sense*: 5'- TAC.TTC.ACG.AGC.AGA.TTG.CA -3'

3.9.7.- PCR para detecção de *Mycoplasma penetrans*:

As amostras com PCR positiva com o uso de *primers* genéricos para a classe *Mollicutes*, foram testadas para a eventual presença de *M. penetrans*. 10 µL das amostras tratadas puras e diluídas à 1: 10 em água destilada purificada (Milli Q®) autoclavada foram amplificados com os *primers* específicos numa concentração de uso de 40 µM. Como controle positivo foi utilizada a cepa GTU-546A1, cedida pelo Dr. Alain Blanchard, Pasteur Institute, Paris. Os *primers* utilizados foram:

- *primer sense*: 5'- AGC.ATT.TCC.TCT.TCT.TAC.AA-3'
- *primer anti-sense* 5'-CAT. GCA.AGT.CGG.ACG.AAG.CA-3'

Este par de *primers* amplificam um fragmento de 410 bp da região que codifica a porção 16S do rRNA (CUNHA et al., 1998).

3.9.7.1- Verificação da especificidade da PCR para *M. penetrans*:

Os produtos de PCR para *M. penetrans* foram analisados por digestão com a endonuclease de restrição Ava II, resultando em um fragmento de 269 e outro de 141 bp (CUNHA et al., 1998): 25µL do produto amplificado das amostras positivas para *M. penetrans* por PCR foram incubados a 37°C por 1 hora em tampão REact® 2 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA) uma vez concentrado, contendo 1µL de enzima Ava II (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA), para 50µL de volume final, em H₂O MilliQ® autoclavada. Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, e visualizados em transiluminador U.V.

3.9.8.- Deteção de *M. genitalium* pela técnica de PCR :

As amostras com PCR positiva com o uso de *primers* genéricos para a classe *Mollicutes* foram ainda testadas para a eventual presença de *M. genitalium*. 10 µL das amostras tratadas puras e diluídas à 1: 10 em água destilada purificada (Milli Q®) autoclavada foram amplificados com os seguintes *primers*, na concentração de uso de 30 µM:

- *primer sense*: 5'- GAA.TGA.CTC.TAG.CAG.GCA.ATG.GCT.G -3'
- *primer anti-sense* 5'- ATT.TGC.CTT.TTA.CAA.GTT.GGC.T -3'

Este par de *primers* amplifica um fragmento de 809 bp da região que codifica a porção 16S do rRNA.

3.9.8.1- Verificação da especificidade da PCR para *M. genitalium*:

A especificidade da amplificação do DNA de *M. genitalium* pela técnica de PCR foi avaliada pelo padrão de restrição por digestão do produto amplificado com a endonuclease Xba I, resultando em um fragmento

de 201 bp, e outro de 608 bp. 20 μ L do produto amplificado foram digeridos com 2 U de Xba I (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA), com 0,4 μ L de tampão de reação 10 vezes concentrado (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA) em 40 μ L de volume final de reação. Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, visualizados em transiluminador U.V.

3.9.9- Detecção de *M. fermentans* pela técnica de PCR :

As amostras com PCR positiva com o uso de *primers* para a classe *Mollicutes* foram testadas também para a eventual presença de *M. fermentans*: 10 μ L das amostras tratadas puras e diluídas a 1: 10 em água destilada purificada (Milli Q®) autoclavada foram amplificados com os seguintes *primers* , numa concentração de uso de 40 μ M:

- *primer sense*: 5'- AAG.AAG.CGT.TTC.TTC.GCT.GG -3'
- *primer anti-sense* 5'- TAA.TCC.TGT.TTG.CTC.CCC.AC -3'

Este par de *primers* amplifica um fragmento de 588 bp da região que codifica a porção 16S do rRNA (DUSSURGET et al., 1994).

3.9.9.1- Verificação da especificidade da PCR para *M. fermentans*:

A especificidade da amplificação do DNA de *M. fermentans* pela técnica de PCR foi avaliada pelo padrão de restrição por digestão do produto amplificado com a endonuclease Ava II, resultando em um fragmento de 212 bp e outro de 376 bp. 20 μ L do produto amplificado foram digeridos com 2 U de Ava II (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA), com 0,4 μ L de tampão de reação 10 vezes concentrado (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA) em 40 μ L de volume final de reação. Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, e visualizados em transiluminador U.V.

3.9.10.- Detecção de *M. pneumoniae* por PCR:

As amostras com PCR positiva com o uso de *primers* para a classe *Mollicutes* foram testadas também para a eventual presença de *M. pneumoniae*: 10 µL das amostras tratadas puras e diluídas à 1: 10 em água destilada purificada (Milli Q®) autoclavada foram amplificadas com os seguintes *primers* , numa concentração de uso de 37 µM:

- *primer sense*: 5'- CCT.GCA.AGG.GTT.CGT.TAT. TT -3'
- *primer anti-sense* 5'- ACG.AGC.TGA.CGA.CAA.CCA.TGC.AC -3'

Este par de *primers* amplifica um fragmento de 864 bp da região que codifica a porção 16S do rRNA (DUSSURGET et al., 1994).

3.9.11.- Detecção dos produtos de PCR:

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose à 0,8% em sistema contínuo, utilizando tampão de corrida TBE (Tris 1M, ácido bórico 1M, EDTA 0,025M) em H₂O MilliQ® autoclavada com 40 µg de brometo de etídio para cada 100 mL: 18µL das amostras foram misturadas com 2µL de tampão de amostra (glicerol 50%, fosfato de sódio 0,1 M, azul de bromofenol 4%), aplicados no gel e submetidos à 100 V por cerca de uma hora. Como marcador de peso molecular foi utilizado o 100 bp DNA Ladder (Gibco BRL, Gaithersburg, MD USA), composto por 15 fragmentos com 100 bp de diferença (100-1.500 bp) e mais um fragmento de 2.072 bp. O fragmento de 600 bp aparece como uma banda mais intensa. A visualização foi feita em transiluminador U.V. (SAMBROOK, 1989).

3.10.- Metodologia utilizada na padronização dos testes de ELISA e Immunoblot para detecção de anticorpos anti- *M. penetrans*:

3.10.1.-Obtenção de antígeno total de *M. penetrans*:

Para obter uma preparação antigênica bruta de *M. penetrans*, 500 mL de meio de cultura SP-4 com o microrganismo em fase exponencial de crescimento foram centrifugados a 13.000 g por 1 hora, e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi homogeneizado com pipeta Pasteur, ressuspenso em 2 tubos com 40 mL de solução fisiológica estéril, e centrifugado novamente à 13.000 g por 1 hora. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 10 mL de PBS pH 7,4 e timerosal 0,025 %. A dosagem de proteínas foi feita pelo método do ácido bicinônico (Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce Inc, Illinois, USA), e a concentração ajustada para cerca de 1,0 mg por mL. A preparação antigênica foi dividida em alíquotas e armazenada a - 20 °C.

3.10.2.- Obtenção da fração LAMP (*Lipid Associated Membrane Proteins*) de *M. penetrans*:

A fração antigênica constituída de lipoproteínas de membrana de *M. penetrans* (WANG et al., 1982), foi obtida a partir de 500 mL de meio de cultura SP-4 com o microrganismo em fase exponencial de crescimento, centrifugados por 50 minutos a 12.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 60 mL de tampão 1 (PBS pH = 7,4 e Timerosal 0,025 %) e novamente centrifugado por 30 minutos a 20.000 g a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento ressuspenso em 60 mL de tampão 1 e centrifugado como anteriormente. O sobrenadante foi desprezado, ressuspenso em 45 mL de tampão 2 (Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,0). A seguir, foram adicionados 5 mL de Triton X-114 à 10 % em água bidestilada e a preparação submetida três vezes à sonicação por 1 minuto a 2 mA, com intervalos de 1 minuto, em banho de gelo, seguida de incubação por 2,5 horas a 4 °C sob agitação. A

mistura foi centrifugada por 30 minutos a 20.000 g a 4 °C, sendo o sobrenadante chamado extrato Triton X-114, o qual foi novamente submetido à purificação por partição de fase. O extrato foi incubado por 5 minutos a 30 °C, centrifugado por 5 minutos a 2.500 g, a temperatura ambiente. A fase detergente (inferior) foi separada, sendo adicionado o mesmo volume de tampão 2, e a mistura incubada e centrifugada como anteriormente. A fase detergente foi retirada, e o processo de partição de fase repetido mais uma vez (WANG et al., 1992). A dosagem de proteínas foi feita pelo método do ácido bicínico (Micro BCA Protein Assay Kit, Pierce, Illinois, USA). Foi adicionado inibidor de protease PMSF (fluoreto de fenilmetil sulfonil) à 4×10^{-1} mM, a preparação foi separada em alíquotas, e armazenada a -20 °C.

3.10.3.- Caracterização dos antígenos de *M. penetrans* :

3.10.3.1.- SDS-PAGE da fração LAMP:

As preparações antigênicas de *M. penetrans* foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE à 10% em condições redutoras, com gel de empilhamento a 3%. Antes da aplicação no gel, as amostras foram tratadas com 2-mercaptoetanol a 5%, por aquecimento a 100 °C por 10 minutos, de acordo com LAEMMLI (1970). As proteínas foram submetidas a 50 V durante a passagem pelo gel de empilhamento, e 150 V durante a passagem pelo gel de separação. Após a eletroforese, o gel de separação foi fixado por 30 minutos em solução de metanol (50% v/v) e ácido acético glacial (7% v/v). A coloração foi feita por 60 minutos com Comassie Blue-R (0,25%) em solução fixadora. O excesso de corante foi removido por lavagens sucessivas com solução de metanol (5% v/v) e ácido acético glacial (7% v/v).

3.10.3.2.- Transferência da fração LAMP de *M. penetrans* separada por SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose:

O gel com a fração LAMP separada por SDS-PAGE à 10% foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose entre 6 folhas de papel de filtro comum, 2 folhas de papel Whatmann nº 3, e 1 folha de papel Whatmann nº 1, embebidas em tampão de transferência (Tris 0,025 M, Glicina 0,2 M, Metanol 20 %). A transferência foi realizada em sistema semi-seco (Novablot®, Pharmacia), por 1,5 horas, a 0,8 mA por cm² de gel (TOWBIN et al., 1979).

3.10.3.3.- Imunoblot com soro hiperimune de coelho e soro controle positivo humano:

A fração LAMP submetida à eletroforese em SDS-PAGE à 10% na concentração de 2 µg por mm de gel foi transferida para membranas de nitrocelulose como descrito acima. As membranas foram cortadas em tiras de 3 mm de largura, que foram colocadas, independentemente, em solução bloqueadora (PBS pH 7,4, Tween 20 - 0,05%, leite em pó desnatado 5%) por 2 horas, sob agitação constante. As amostras de soro hiperimune de coelho e soros humanos (cedidos pelo Dr. Alain Blanchard, Pasteur Institute, Paris, França) diluídas a 1:100 na mesma solução foram incubadas por 18 horas sob agitação à 4° C. Após este período, as tiras foram lavadas 3 vezes com solução de PBS pH 7,4 + Tween 20-0,05%, e incubadas com anti- imunoglobulina total de coelho, ou anti-imunoglobulina humana total, marcadas com peroxidase, por 2 horas. Em seguida, as tiras foram lavadas 3 vezes como acima, e duas vezes com PBS pH 7,4 sem adição de Tween. A revelação foi feita tratando as tiras com 1 mL de solução de diaminobenzidina e H₂O₂ (DAB 5 mg, PBS pH 7,4 - 30 mL, H₂O₂ - 30 µL) (TOWBIN et al., 1979).

3.10.4.- Pesquisa de anticorpos séricos anti- *M. penetrans* por ELISA:

Placas de 96 cavidades (Inlab) foram sensibilizadas por 18 horas a 37 °C com 100 µL de fração LAMP (2 µg em proteína por orifício) diluída em tampão TBC (Na₂CO₃ 0,015M, NaHCO₃ 0,04M). As placas foram lavadas 4 vezes com solução de PBS pH 7,4 e Tween 20 - 0,05 %, e bloqueadas por 30 minutos a 37 °C com leite desnatado 5 %, Tween 20 - 0,05 %, em PBS pH 7,4. Após uma lavagem, 100 µL das amostras a 1: 100 em solução diluente (PBS pH 7,4 , leite desnatado 1 % e Tween 20 - 0,05 %) foram adicionadas em duplicata e incubadas à 37 °C por 90 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes, e foram adicionados 100 µL de conjugado contra as cadeias pesadas γ , μ e α das imunoglobulinas, marcado com peroxidase, diluído segundo o respectivo título, em solução diluente. As placas foram incubadas a 37 °C por 90 minutos. Após lavadas 4 vezes, foram adicionados 100 µL de substrato tetrametilbenzidina e H₂O₂ (TMB, La Roche Ltd, Basel) em cada cavidade, e incubadas a 37 °C por 30 minutos. A reação foi bloqueada com 100 µL de solução de H₂SO₄ 4N, e a leitura da densidade ótica feita em leitora de microplaca a 450 nm (WANG et al., 1992).

Para se determinar o limite de reatividade do ELISA (cut-off), foram analisadas amostras de soro de 86 indivíduos doadores de sangue saudáveis. Foram consideradas positivas as amostras com leitura de D.O. maiores ou iguais à média das D.O.s destes soros mais três desvios padrões para IgG e IgA, e a média mais dois desvios padrões para IgM.

3.10.5.- Imunoblot para *M. penetrans*:

As amostras positivas para anticorpos anti-*M. penetrans* por ELISA para os respectivos isótipos foram avaliadas por Imunoblot, observando-se a reação com a proteína de peso molecular de cerca de 38 kD (GRAU et al., 1995). Tiras de 3mm de membrana de nitrocelulose com 2

μg da fração LAMP por mm de gel submetida à eletroforese em SDS-PAGE e transferida como previamente descrito, foram incubadas com o soro diluído a 1: 20 em PBS pH 7,4, Tween 20 - 0,05% e leite desnatado 5%, como anteriormente. Como conjugados, foram utilizados anticorpos anti- γ , μ ou α marcados com peroxidase, para os isótipos IgG, IgM e IgA, respectivamente, de acordo com o resultado do ELISA, e revelação com diaminobenzidina (DAB).

3.10.6.- Verificação da especificidade do Imunoblot para *M. penetrans*:

Para analisar a especificidade do Imunoblot para *M. penetrans* como confirmação dos resultados de ELISA, foram utilizados amostras de soro de indivíduos HIV negativos com as seguintes características: sete indivíduos com sorologia positiva para *M. pneumoniae* (Platelia IgM); três indivíduos infectados por *U. urealyticum*, e três indivíduos infectados por *M. hominis*. Todas as amostras de soro utilizadas foram negativas no teste de ELISA para *M. penetrans*, para todos os isótipos de imunoglobulina testados. Os testes foram realizados com as amostras diluídas a 1: 20, para os isótipos IgG, IgM e IgA, utilizando o conjugado adequado.

3.11.-Análise estatística:

A análise da significância estatística dos dados obtidos por este trabalho foi feita utilizando-se o Teste Exato de Fisher, através do programa GraphPad InStat™ (San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- CULTURA DE MICOPLASMAS:

No grupo de indivíduos HIV-positivos, 21/106 (19,8 %) tiveram cultura positiva para mollicutes, tanto nas amostras de raspado uretral como de primeiro jato urinário. Destes, em 20 (18,9 %) foi isolado *Ureaplasma urealyticum*, identificado pelo alcalinização do meio líquido U10, e por sua morfologia colonial característica no meio sólido A7. *Mycoplasma hominis* foi isolado de 8/106 indivíduos (7,5 %), sendo 7 casos (6,6 %) de co-infecção com *U. urealyticum*.

No grupo de indivíduos HIV-negativos com queixa de DST, 15/110 (13,6 %) tiveram cultura positiva. *U. urealyticum* foi isolado de 15/110 (13,6%), e *M. hominis* de 1/110 indivíduos (0,9%), sendo este caso de co-infecção com *U. urealyticum* (fig. 5). Os resultados foram idênticos para os dois tipos de amostras utilizados.

De nenhuma amostra de ambos os grupos, tanto de raspado uretral quanto de primeiro jato urinário, foi obtido crescimento de qualquer outra espécie em meio SP-4, observado pela acidificação do meio líquido e formação de colônias no meio sólido, mesmo com os procedimentos de repiques cegos e diluições das amostras.

Figura 5. Percentagem da positividade da cultura para mollicutes nas amostras de raspado uretral e primeiro jato urinário, dos grupos de indivíduos HIV-positivos e DST.

O Teste Exato de Fisher demonstrou diferença significativa nas taxas de isolamento de *M. hominis* obtidas nos dois grupos ($P=0,02$), o que não foi observado para *U. urealyticum* ($P=0,37$).

4.2.- QUANTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS:

No grupo de indivíduos HIV-positivos, 17/20 (85 %) dos isolados de *U. urealyticum* apresentaram concentrações significativas, ou seja, maiores ou iguais à 10^4 CCU/mL. Quanto aos isolados de *M. hominis*, 5/8 (62,5 %) estavam em concentrações significativas, ou seja, maiores ou iguais à 10^3 CCU/mL.

No grupo de DST, 14/15 isolados de *U. urealyticum* (93,3 %) estavam em concentrações significativas. O único isolamento de *M. hominis* obtido neste grupo apresentava concentração significante (fig. 6).

Figura 6. Percentagem de mollicutes isolados em concentrações significativas das amostras de raspado uretral, em relação ao número total de isolados, nos grupos HIV-positivo e DST.

Não houve diferenças entre as taxas de isolamento em concentração significativa nos dois grupos para *M. hominis* ($P=1,00$), bem como para *U. urealyticum* ($P=0,62$).

4.3.- IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS:

Além da morfologia colonial típica do gênero em meio sólido A7 (fig. 7), *M. hominis* foi identificado pela técnica de Imunodifusão Dupla de Ouchterlony, com soro hiperimune obtido em coelho (fig. 8), e pela técnica da PCR a partir do microrganismo cultivado em meio líquido de Arginina (fig. 9). Todos os isolados, das amostras de raspado uretral dos dois grupos, que em meio sólido apresentaram morfologia colonial típica do gênero, e no meio líquido produziram alcalinização do pH, foram confirmados como sendo *M. hominis*, por ambas as técnicas.

Figura 7. Colônias de *Mycoplasma hominis* cultivadas de amostra clínica de paciente HIV-1 positivo, em meio sólido A7 (aumento de 40x).

Figura 8. Lâmina de Imunodifusão Dupla de Ouchterlony para identificação de *M. hominis*: Centro: soro hiperimune de coelho; 1: cepa ATCC 23114 de *M. hominis*; 2 e 3: cepas isoladas de amostras clínicas.

Figura 9. Produtos de PCR para *M. hominis*, para identificação de mollicutes com crescimento em meio de Arginina, em gel de agarose a 0,8%. Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder. Linhas 1: controle positivo, 2: controle de reação. 3-8: amostras positivas.

Todos os produtos de PCR para *M. hominis* a partir dos isolados em meio de cultura, mostraram o mesmo padrão de restrição que a cepa padrão, por digestão com a enzima Kpn I (fig. 10).

Figura 10. Análise do padrão de restrição por digestão dos produtos de PCR para *M. hominis* com a enzima Kpn I. Linhas 1: 100 bp DNA Ladder; 2: produto de PCR da cepa ATCC 23114 não digerido; 4,6 e 8: produto de PCR de amostras clínicas não digerido; 3, 5, 7 e 9: produtos de PCR digeridos.

Os isolados de *U. urealyticum* foram identificados por sua morfologia colonial típica em meio sólido A₇ (fig. 11), e pela técnica de PCR. Todos os isolados, dos dois grupos estudados, com esta morfologia colonial e apresentando alcalinização do pH do meio líquido U₁₀ decorrente da metabolização da uréia, foram confirmados como sendo *U. urealyticum* por esta metodologia (fig. 12).

Figura 11. ➤ Colônias de *Ureaplasma urealyticum* cultivadas de amostra clínica infectando células epiteliais em meio sólido A₇ (aumento de 40x).
➡ células epiteliais não infectadas.

Figura 12. Produtos de PCR para *U. urealyticum* com *primers* que detectam os grupos A+B, para identificação de mollicutes com crescimento em meio U₁₀, em gel de agarose a 0,8%. Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder. Linhas 1: controle positivo, 2: controle de reação, 3-6: amostras positivas.

Quanto à distribuição das cepas de *U. urealyticum* isoladas dentre os dois grupos de patogenicidade, determinada pela técnica da PCR (fig. 13), dos indivíduos HIV-positivos, 10/20 (50%) enquadraram-se no grupo A, e 10/20 (50%) no grupo B.

Dos isolados dos indivíduos HIV-negativos com DST, 8/15 (53,3 %) enquadraram-se no grupo A, e 7/15 (46,7 %) no grupo B (fig. 14).

Figura 13. Produtos de PCR para *U. urealyticum* com *primers* que detectam cepas pertencentes ao grupo B, em gel de agarose a 0,8%. Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder. Linhas 1: controle positivo, 2: controle de reação, 4,6,7,8,11 e 12: amostras positivas, 3,5,9 e 10: amostras negativas.

Figura 14. Distribuição das cepas de *U. urealyticum* quanto aos grupos A e B, isoladas dos indivíduos HIV-positivos, e HIV-negativos com DST.

Não há diferenças estatísticas quanto à distribuição dos isolados de *U. urealyticum* nos grupos A e B nos indivíduos HIV positivos ($P=1,25$), bem como nos indivíduos do grupo DST ($P=1,00$).

4.4.- DETECÇÃO DE MOLICUTES POR PCR COM O USO DE PRIMERS GENÉRICOS:

O uso de *primers* genéricos permitiu a detecção de molicutes pela observação do produto amplificado de 716 bp na eletroforese em gel de agarose (fig. 15). Todas as amostras apresentaram o plasmídeo na reação, ao menos com a amostra diluída 1: 10. No grupo HIV-positivo, 20/106 amostras de urina (18,9 %) e 41/106 amostras de raspado uretral (38,7 %) foram positivas.

No grupo DST, nenhuma amostra de urina (0%) apresentou reação positiva por PCR para molicutes, enquanto 23/110 amostras de raspado uretral (20,9 %) tiveram reação positiva (fig. 16).

Figura 15. Detecção dos produtos da PCR Multiplex para o gênero *Mycoplasma* nas amostras clínicas em gel de agarose à 0,8%, corado com brometo de etídio, sob luz U.V. O plasmídeo apresenta um produto de 965 bp, e os *primers* para molicutes amplificam uma região de 716 bp. Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder, Linhas 1: controle positivo; 2: controle de reação; 3 e 4: amostras positivas; 5-14: amostras negativas.

Figura 16. Positividade da PCR para o gênero *Mycoplasma* nos grupos HIV-positivo e DST, nas amostras de urina e raspado uretral.

A positividade da PCR com *primers* genéricos foi significativamente maior no grupo HIV que no grupo DST, tanto nas amostras de raspado uretral ($P=0,005$) quanto nas amostras de urina ($P<0,0001$). Do mesmo modo, a positividade da PCR foi maior nas amostras de raspado uretral do que nas amostras de urina tanto no grupo HIV ($P=0,002$) quanto no grupo DST ($P<0,0001$).

Em todas as amostras com cultura positiva para micoplasmas e PCR negativa com *primers* genéricos, foi detectado o gene da globina humana por PCR, indicando que não houve perda de DNA no processo de extração. A ausência de inibidores foi também confirmada pelo uso do plasmídeo, cuja amplificação também pode ser observada em todas as amostras, ao menos diluídas 1: 10 (fig. 17).

Figura 17. Amostras 1,2,3 e 4 em gel de agarose a 0,8%. Linhas **a**: PCR com plasmídeo com amostra pura; **c**: PCR com plasmídeo com amostra diluída 1:10; **b**: PCR para globina com amostra pura; **d**: PCR para globina com amostra diluída 1:10.

4.5.- RELAÇÃO DA POSITIVIDADE NA DETECÇÃO DE MOLICUTES POR CULTURA E PCR:

No grupo HIV-positivo, 21/106 indivíduos (19,8 %) tiveram cultura positiva para molícutes. Destes, 3/21 (14,3 %) tiveram PCR positiva tanto na urina quanto no raspado uretral, 1/21 (4,8 %) tiveram PCR positiva somente na urina, e 10/21 (47,6 %) tiveram PCR positiva somente no raspado uretral. 7/21 indivíduos (33,3 %) tiveram reação negativa nos dois tipos de amostra (fig. 18).

	Urina + (%)	Urina – (%)	Total (%)
Raspado + (%)	3/21 (14,3)	10/21 (47,6)	13/21 (61,9)
Raspado – (%)	1/21 (4,8)	7/21 (33,3)	8/21 (38,1)
Total (%)	4/21 (19)	17/21 (80,9)	

Figura 18. Relação da positividade da PCR com *primers* genéricos, nas amostras de urina e raspado uretral do grupo de indivíduos HIV-positivos, que tiveram cultura positiva para micoplasmas.

No grupo DST, dos 15 indivíduos com molículos isolados por cultura, nenhum teve PCR positiva em amostras de urina. Destes, 4/15 (26,7 %) tiveram PCR positiva nas amostras de raspado uretral. (fig. 19).

	Urina + (%)	Urina – (%)	Total (%)
Raspado + (%)	0/15	4/15 (26,7)	4/15 (26,7)
Raspado – (%)	0/15	11/15 (73,3)	11/15 (73,3)
Total (%)	0/15	15/15 (100)	

Figura 19. Relação da positividade da PCR com *primers* genéricos, nas amostras de urina e raspado uretral do grupo DST que tiveram cultura positiva para micoplasmas.

Dentre indivíduos do grupo HIV-positivo, com resultado de cultura positivo, e PCR negativa nos dois tipos de amostra, 5/7 (71,4 %) tiveram concentrações de micoplasmas menor ou igual à 10^3 CCU/mL, e 2/7 (28,6 %) tiveram concentrações maiores ou iguais à 10^5 CCU/mL.

No grupo DST, 4 das 11 amostras (36,4 %) com cultura positiva, porém com PCR negativa em raspado uretral, tinham concentrações de micoplasmas menores ou igual à 10^3 CCU/mL; 3/11 (27,3 %) tinham concentrações de 10^4 CCU/mL, e 4/11 (36,4 %), maiores ou iguais à 10^5 CCU/mL.

4.6.- DETECÇÃO DE MOLÍCUTES POR PCR, NAS AMOSTRAS DOS INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS E NEGATIVOS COM USO DE *PRIMERS* ESPECÍFICOS:

4.6.1.- *M. hominis*:

No grupo de indivíduos HIV-positivos, em nenhuma amostra com cultura negativa, e PCR positiva com *primers* genéricos, foi detectada a presença de *M. hominis* por PCR, com o uso de *primers* específicos, bem como nas amostras dos indivíduos do grupo DST.

4.6.2.- *U. urealyticum*:

U. urealyticum não foi detectado pela técnica da PCR em nenhuma amostras do grupo HIV-positivo, com cultura negativa para mollicutes, utilizando-se os *primers* que identificam os grupo A+B,.

Entretanto, no grupo DST, uma amostra de raspado uretral foi positiva para *U. urealyticum* por PCR, entre 19 com cultura negativa e PCR positiva com *primers* genéricos (5,3 %). Esta amostra não reagiu com os *primers* que detectam o grupo B, sendo portanto enquadrada no grupo A.

4.6.3.- *M. genitalium*:

No grupo HIV-positivo, *M. genitalium* foi detectado por PCR em 2/106 indivíduos (1,9 %) em amostra de raspado uretral, e em um outro indivíduo em amostra de urina (0,9 %) (fig. 20). No grupo DST, foi detectado em 12/110 indivíduos (9,1 %), somente em amostras de raspado uretral (fig. 21).

Figura 20. PCR para *M. genitalium* em amostras clínicas, em gel de agarose a 0,8%. Linhas 1: controle positivo; 2: controle de reação; 3-12: amostras negativas; 13: amostra positiva.

Figura 21. Percentagem da positividade da detecção de *M. genitalium* por PCR nas amostras de urina e raspado uretral, nos grupos HIV e DST.

A maior taxa de detecção de *M. genitalium* no grupo DST foi estatisticamente significativa nas amostras de raspado ($P=0,01$), o que não foi observado nas amostras de urina ($P=0,49$).

4.6.3.1.- Verificação da especificidade da PCR para *M. genitalium*:

O padrão de restrição dos produtos de PCR para *M. genitalium*, por digestão com a enzima Xba I foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%. Todas as amostras detectadas tiveram o mesmo padrão que a cepa de referência (fig. 22).

Figura 22. Análise do padrão de restrição por digestão dos produtos de PCR para *M. genitalium* com a enzima Xba I. 1: 100 bp DNA Ladder; 2: produto de PCR da cepa ATCC 33530 não digerido; 4: produto de PCR de amostra clínica não digerido; 3 e 5: produtos de PCR digeridos.

4.6.4.- *M. fermentans*:

No grupo DST, foi detectada em uma amostra de raspado uretral a presença de *M. fermentans* por PCR com *primers* específicos. Entretanto, no grupo de indivíduos HIV-positivos, *M. fermentans* foi detectado em 6/106 amostras (5,7%) de raspado uretral (fig. 23).

Figura 23. PCR para *M. fermentans* em amostras clínicas, em gel de agarose a 0,8%. Linhas 1: controle positivo; 2: controle de reação; 3-8,10,11: amostras negativas; 9: amostra positiva.

Entretanto, esta diferença na taxa de detecção de *M. fermentans* por PCR nos dois grupos não é estatisticamente significativa ($P=0,06$).

4.6.4.1.- Verificação da especificidade da PCR para *M. fermentans*:

A especificidade da PCR para *M. fermentans* foi verificada pela análise dos padrões de restrição dos produtos de PCR das amostras clínicas, por digestão com a enzima *Ava II*. Todos os produtos detectados mostraram o mesmo padrão, em comparação com a cepa de referência (fig. 24).

Figura 24. Análise do padrão de restrição por digestão dos produtos de PCR para *M. fermentans* com a enzima *Ava II*. Linhas 1: 100 bp DNA Ladder; 2: produto de PCR da cepa ATCC 19989 não digerido; 4: produto de PCR de amostra clínica não digerido; 3 e 5: produtos de PCR digeridos.

4.6.5.- *M. penetrans*:

No grupo de indivíduos HIV-positivos, *M. penetrans* foi detectado em 7/106 amostras de urina (6,6 %) por PCR (fig. 25). Nenhuma amostra de raspado uretral teve reação positiva. No grupo DST, *M. penetrans* não foi detectado em nenhuma amostra analisada, tanto de

raspado uretral quanto de primeiro jato urinário. Esta diferença é estatisticamente significativa ($P=0,006$).

Figura 25. Detecção dos produtos da PCR para *Mycoplasma penetrans* nas amostras clínicas em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio, sob luz U.V. Marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder, Linhas 1: controle positivo; 2: controle de reação; 3 e 4: amostras positivas; 5 e 6: amostras negativas.

4.6.5.1.- Verificação da especificidade da PCR para *M. penetrans*:

Os produtos de PCR para *M. penetrans* foram analisados por digestão com a enzima *Ava II*. Todas as amostras positivas tiveram o mesmo padrão de restrição que a cepa GTU-546A1, confirmando a presença de ácido nucleico de *M. penetrans* nas amostras de urina de indivíduos HIV-positivos de nossa população (fig. 26).

Figura 26. Análise do padrão de restrição por digestão dos produtos de PCR para *M. penetrans* com a enzima *Ava II*. Linhas 1: produto de PCR da cepa GTU-546A1 não digerido; 3 e 5: produto de PCR de amostras clínicas não digerido; 2,4 e 6: produtos de PCR digeridos.

4.6.6.- *M. pneumoniae*:

Das amostras com resultado de cultura negativo, porém com PCR positiva com o uso de *primers* genéricos, nenhuma apresentou PCR positiva com o uso de *primers* específicos para *M. pneumoniae*, tanto no grupo de indivíduos HIV-positivos, quanto do grupo DST (fig. 27).

Figura 27. Detecção dos produtos da PCR para *M. pneumoniae* nas amostras clínicas em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio, sob luz U.V. Linhas 1: marcador de peso molecular: 100 bp DNA Ladder; 2: controle positivo; 3: controle de reação; 4-7: amostras.

4.7.- CARACTERIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE *Mycoplasma penetrans*:

4.7.1.- Eletroforese em SDS-PAGE:

Observando a preparação de antígeno total de *M. penetrans*, bem como a fração de lipoproteínas de membrana (LAMP), separados por eletroforese em SDS-PAGE, pode-se notar que os polipeptídeos com peso molecular aparente de 38 e 42 kD, são as presentes em maior quantidade no microorganismo (fig. 28).

4.7.2.- Immunoblot com soros hiperimunes de coelho:

O Immunoblot com a fração LAMP (*Lipid Associated Membrane Proteins*) submetido à SDS-PAGE e transferida para membrana de nitrocelulose, com soros hiperimunes obtidos de coelhos, mostra que os peptídeos de 38 e 42 kD são também os imunodominantes (fig. 29).

4.7.3.- Immunoblot com soros humanos:

A análise da fração LAMP de *M. penetrans*, por Immunoblot, mostra que os peptídeos de 38 e 42 kD são os imunodominantes também em relação às amostras de soro humano (fig. 30).

Figura 28. Eletroforese em SDS-PAGE a 10% em condições redutoras de antígeno total (T) e fração LAMP (L) de *Mycoplasma penetrans*, cepa GTU-546A1.

Figura 29. Immunoblot com soros hiperimunes obtidos de coelhos, imunizados com antígeno total de *M. penetrans*. C: soro pré-imunização.

Figura 30. Imunoblot com soros humanos, usando como antígeno fração LAMP de *M. penetrans* e conjugado anti- IgG. CN: soro controle negativo; CP: soro controle positivo; 10, 21, 34 e 37: amostras positivas para o peptídeo de 38 kD.

4.8.- DETECÇÃO DE ANTICORPOS SÉRICOS ANTI-*Mycoplasma penetrans* POR ELISA:

Analisando os resultados das leituras de densidade ótica (D.O.) das amostras utilizadas para o cálculo do limiar de reatividade do ELISA, encontramos uma D.O. média de 0,11 para IgG, com desvio padrão de 0,04. Para IgM a média foi de 0,11 com desvio padrão de 0,17, e para IgA a média foi de 0,04 com desvio padrão de 0,02. Deste modo, foram consideradas positivas as amostras com D.O. maior que 0,23 para IgG, 0,45 para IgM e 0,10 para IgA. Neste grupo controle, 1/86 amostra (1,2%) apresentou leitura de D.O. acima do limiar de reatividade para IgG, 5/86 (5,8%) para IgM e 1/86 (1,2%) para IgA.

Das 106 amostras de soro analisadas do grupo de indivíduos HIV-positivos, foram detectados anticorpos da classe IgG anti-*M. penetrans* em 27 (25,5 %). IgM foi detectado em 4 amostras (3,8 %), e IgA em 16 (15,1 %).

No grupo DST, IgG foi detectado em 19/110 amostras (17,3%), IgM em 10 (9,1 %), e IgA em 19 amostras (17,3 %) (fig. 31).

Dentre os indivíduos do grupo HIV-positivo que tiveram reação de PCR para *M. penetrans* positiva nas amostras de urina, 4/7 (57,1%) não apresentaram anticorpos séricos anti- *M. penetrans*, de qualquer isótipo pesquisado. Dois indivíduos apresentaram somente IgG (28,6%), e um (14,3%) apresentou IgG e IgA anti- *M. penetrans* no soro.

Figura 31. Prevalência (%) de anticorpos das classes IgG, IgM e IgA anti-*M. penetrans* nos grupos de indivíduos HIV-positivos e DST, detectados por ELISA usando a fração LAMP como antígeno.

As taxas de IgG observadas nos HIV e DST são significativamente maiores do que as observadas nos controles ($P < 0,0001$). Porém, entre os dois primeiros grupos, não há diferença significativa ($P = 0,18$).

Quanto à IgM, não há diferença entre os grupos HIV ($P = 0,52$) e DST ($P = 0,43$) em comparação aos controles, nem entre os dois primeiros grupos ($P = 0,16$).

Para IgA, as taxas também são maiores no grupo HIV ($P = 0,0005$) e DST ($P < 0,0001$) comparados aos controles, sem diferença entre os dois primeiros grupos ($P = 0,71$).

As leituras obtidas para as amostras dos grupos estudados, em comparação com as do grupo utilizado para o cálculo do limiar de reatividade, no teste ELISA para a detecção de anticorpos anti- *M. penetrans* das classes IgG, IgM e IgA, são apresentadas nas figuras 32, 33 e 34, respectivamente.

Figura 32. Resultados obtidos em absorbância para as amostras de soro de 106 indivíduos HIV-positivos, 110 indivíduos do grupo DST, em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgG anti- *M. penetrans*, pelo teste ELISA com a fração LAMP como antígeno.

Figura 33. Resultados obtidos em absorbância para as amostras de soro de 106 indivíduos HIV-positivos, 110 indivíduos do grupo DST, em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgM anti- *M. penetrans*, pelo teste ELISA com a fração LAMP como antígeno.

Figura 34. Resultados obtidos em absorvância para as amostras de soro de 106 indivíduos HIV-positivos, 110 indivíduos do grupo DST, em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgA anti- *M. penetrans*, pelo teste ELISA com a fração LAMP como antígeno.

4.9.- RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE LINFÓCITOS CD4+ E CD8+ DOS INDIVÍDUOS HIV- POSITIVOS E ANTICORPOS ANTI- *M. penetrans*:

Dos 106 indivíduos HIV- positivos estudados, foi possível obter os resultados da contagem das células CD4+ e CD8+ de 53 (50%). Destes, 30/50 (60%) tinham relação CD4:CD8 menor que 0,3.

Com relação ao isótipo IgG, foram detectados anticorpos anti- *M. penetrans* em 4/30 (13,3 %) dos indivíduos com relação CD4: CD8 menor que 0,3, em comparação com 4/20 (20 %) dos indivíduos com relação maior ou igual à 0,3. Para IgM, as proporções foram de 3/30 (10 %) e 0/20 (0 %), e para IgA, 4/30 (20%) e 1/20 (5%), respectivamente (fig. 35).

Figura 35. Positividade da pesquisa de anticorpos anti- *M. penetrans* por ELISA no grupo HIV- positivo, para os isótipos pesquisados, quanto à relação da contagem das células CD4: CD8 (R).

Entretanto, não há diferença significativa nas taxas de IgG ($P=0,70$), IgM ($P=0,27$) ou IgA ($P=0,64$) entre os indivíduos com relação CD4/CD8 menor e maior ou igual a 0,3.

4.10.- OBSERVAÇÃO DA REATIVIDADE DOS SOROS POSITIVOS POR ELISA COM O PEPTÍDEO DE 38 kD DE *M. penetrans* POR IMUNOBLOT:

No grupo HIV-positivo, dentre os soros positivos por ELISA para IgG, a banda de 38 kD foi reconhecida por 14/27 amostras (51,8 %). Para IgM, foi reconhecida em 2/4 (50%), e 12/16 amostras (75 %) para IgA.

No grupo DST, nas amostras positivas por ELISA para IgG, a banda de 38 kD foi reconhecida por 9/19 amostras (47,4%), 6/10 (60 %) para IgM, e 10/19 (52,6 %) para IgA (fig. 36).

Figura 36. Percentagem das amostras de soro positivas por ELISA que apresentaram reação com o peptídeo de 38 kD de *M. penetrans* por Imunoblot, dos grupos HIV e DST.

Não há diferença da reatividade com o peptídeo de 38 kD de *M. penetrans* entre os grupos HIV e DST, tanto para IgG (P=1,00), quanto para IgM (P=1,00) ou IgA (P=0,29).

4.11.- VERIFICAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO IMUNOBLOT PARA *M. penetrans*:

Com relação ao isótipo IgG, em 14,3 % das amostra de soro (1/7) de indivíduos infectados por *M. pneumoniae* foi observada reatividade com o peptídeo de 38 kD de *M. penetrans* por Imunoblot. Esta reação também foi observada em 100 % dos soros (3/3) de indivíduos infectados por *M. hominis*, e em nenhuma das 3 amostras de soro de indivíduos infectados com *U. urealyticum* (fig. 37).

Para o isótipo IgM, a reação com o peptídeo de 38 kD de *M. penetrans*, por Imunoblot, não foi observada em nenhuma amostra de soro de indivíduos infectados por *M. pneumoniae*, bem como nas mostras de indivíduos infectados por *M. hominis* e por *U. urealyticum* (fig. 38).

Com relação à IgA, esta reação não foi observada em nenhuma amostras de indivíduos infectados por *M. pneumoniae* e por *U. urealyticum*, mas sim em 1 (33,3%) amostra de soro de indivíduos infectados por *M. hominis* (fig. 39).

Figura 37. Imunoblot com fração LAMP de *M. penetrans* como antígeno com soros de indivíduos infectados por *M. pneumoniae* (linhas 1-7), *U. urealyticum* (linhas 8-10) e *M. hominis* (linhas 11-13), utilizando conjugado anti- IgG. N: controle negativo; P: controle positivo.

Figura 38. Imunoblot com fração LAMP de *M. penetrans* como antígeno com soros de indivíduos infectados por *M. pneumoniae* (linhas 1-7), *U. urealyticum* (linhas 8-10) e *M. hominis* (linhas 11-13), utilizando conjugado anti- IgM. N: controle negativo; P: controle positivo.

Figura 39. Imunoblot com fração LAMP de *M. penetrans* como antígeno com soros de indivíduos infectados por *M. pneumoniae* (linhas 1-7), *U. urealyticum* (linhas 8-10) e *M. hominis* (linhas 11-13), utilizando conjugado anti- IgA. N: controle negativo; P: controle positivo.

DISCUSSÃO

5.- DISCUSSÃO

A participação dos mollicutes na etiologia de doenças humanas vem sendo objeto de investigação de um grupo ainda pequeno de pesquisadores, se comparado aos grupos dedicados às outras classes de agentes infecciosos. O aprimoramento e o desenvolvimento de novas metodologias laboratoriais possibilitou um grande avanço na micoplasmologia, levando à detecção, isolamento e caracterização de novas espécies nos últimos anos. O advento da epidemia da AIDS também trouxe novos horizontes para os pesquisadores, pela implicação dos micoplasmas como fortes candidatos à eventuais co-fatores do HIV na progressão da doença.

No Brasil, pouquíssimos são os grupos empenhados na pesquisa das micoplasmoses humanas, e o diagnóstico laboratorial de rotina restringe-se à sorologia para *M. pneumoniae* nas afecções do trato respiratório, e à cultura de *M. hominis* e *U. urealyticum* em amostras do trato urogenital. Muito ainda resta a ser feito quanto à informação aos clínicos e laboratórios de rotina sobre a importância de outras espécies na etiologia de vários processos patológicos, assim como *M. genitalium* em infecções do trato urogenital. Existem outras lacunas a serem preenchidas, principalmente quanto ao verdadeiro papel de certas espécies, como *M. penetrans* e *M. fermentans* na infecção pelo HIV. Acreditamos que os dados resultantes deste trabalho podem contribuir a nível nacional para uma ampliação do conhecimento sobre a participação dos micoplasmas nos processos infecciosos. Outro aspecto discutido neste trabalho são os métodos

utilizados em sua detecção, a implementação de novas técnicas, seus resultados e dificuldades de execução.

O papel de *U. urealyticum* na etiologia das uretrites não gonocócicas é indiscutível (TAYLOR-ROBINSON, 1997). Nossos resultados, com isolamento deste microrganismo em 13,6 % dos indivíduos com queixa de uretrite, são semelhantes aos descritos na literatura (TAYLOR-ROBINSON, 1996a). O isolamento desta espécie de indivíduos com sintomas da doença tem sido relatado como estando em torno de 12% (KOCH et al., 1997). A importância de seu achado nestes indivíduos, onde além da uretrite, pode ser responsável também por epididimites, tem impacto também quanto a sua possível transmissão às suas parceiras sexuais, nas quais podem causar problemas como infertilidade e, principalmente em gestantes, induzindo nascimentos prematuros, ou até aborto (CASSEL et al., 1983, HOROWITZ et al., 1995, TAYLOR-ROBINSON & MUNDAY, 1988).

Seu isolamento em taxas de 18,9% de indivíduos HIV-positivos chama a atenção para a importância clínica de sua infecção neste grupo. Apesar de não ser estatisticamente superior à taxa encontrada nos indivíduos do grupo DST, os indivíduos do grupo HIV não apresentavam queixa clínica de uretrite. Pela própria característica da AIDS, em estados mais avançados, estes pacientes acabam por não oferecer uma barreira imunológica eficiente à estes microrganismos, permitindo que se instalem na uretra, resultando numa infecção crônica. Além disso, o que é mais importante, infecções extragenitais como peritonites, osteomielites e artrites por *U. urealyticum* tem sido relatadas em indivíduos imunodeprimidos, (BURDGE et al., 1988, JORUP-RONSTROM et al., 1989, HALLER, et al., 1991), doenças estas em que geralmente não se pensa neste agente como uma provável causa do processo. Deste modo, o conhecimento, por parte dos clínicos, das taxas de infecção por *U. urealyticum* neste grupo de pacientes, pode acarretar uma melhora em sua qualidade de vida, considerando sua associação com patologias mais graves.

Com menor participação em infecções do trato urogenital masculino, *M. hominis* é implicado na etiologia de 3-4 % dos casos de uretrite não gonocócica (MÖLLER et al., 1990, TAY et al., 1995). Em nosso estudo, a taxa de isolamento encontrada no grupo DST é ainda menor (0,9 %), considerando que o microrganismo seja o responsável pelo processo que levou à queixa clínica nestes casos.

No grupo de indivíduos HIV-positivos, sua taxa de isolamento (7,5%) foi maior em comparação com o grupo DST, podendo ter aí um papel inclusive mais relevante que *U. urealyticum*, no contexto da imunodeficiência. Vários casos de infecções extragenitais em adultos por *M. hominis* têm sido descritos, como bacteremia, infecções vasculares, osteomielites, peritonites, infecções em vários sítios decorrentes de processos cirúrgicos, meningites, artrites, e também infecções do trato respiratório. Estes tipos de infecções por *M. hominis* parecem estar muito relacionadas principalmente com a depressão da imunidade mediada por células e também com hipogamaglobulinemia (MEYER & CLOUGH, 1993).

A determinação da concentração dos microrganismos presentes nas amostras, tanto para *U. urealyticum* quanto para *M. hominis*, não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos de indivíduos estudados, apesar de ter sido um pouco maior no grupo DST. Isto pode favorecer a indicação de que estes microrganismos podem estar desempenhando um papel mais ativo nos indivíduos infectados pelo HIV, como oportunistas, e não somente estando presentes como meros comensais.

Todos os isolados de *M. hominis* identificados presuntivamente pela técnica de cultivo, com observação de sua morfologia colonial em meio sólido e comportamento bioquímico no meio líquido, foram confirmados pelas técnicas de imunodifusão e PCR. A hipótese da possibilidade de acontecer o isolamento, nas amostras do trato urogenital, de outras espécies de micoplasmas com propriedades semelhantes, erroneamente identificadas como *M. hominis*, não se confirmou (TAYLOR-

ROBINSON, 1996b). Esta observação é concordante com os dados da literatura, que consideram cerca de 99% destes isolados como sendo *M. hominis*.

Os sorotipos de *U. urealyticum* são divididos, por diferenças antigênicas e homologia de DNA, em dois grupos, que compreendem os seguintes sorotipos: grupo A: sorotipos II, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI e XII; e grupo B: sorotipos I, III, VI, XIII e XIV (BARILE, 1986). A esses tem sido consideradas possíveis diferenças quanto aos graus de patogenicidade (CUNHA et al., 1997), tendo sido atribuído aos pertencentes ao grupo B um maior potencial. A classificação dos isolados de *U. urealyticum* em grupos, realizada neste trabalho, demonstrou que os microrganismos responsáveis pelas infecções em questão distribuíram-se de maneira equivalente nos dois sorogrupos. Isto provavelmente seria decorrente da existência de sorotipos com potencial patogênico distribuídos em ambos os grupos, como os sorotipos IV, VIII e X do grupo A, e III e VI do grupo B, os mais freqüentemente encontrados participando de doenças do trato genital feminino (CRACEA et al., 1984, NAESSENS et al., 1988, ROBERTSON et al., 1986, ZHENG et al., 1992).

Pelas metodologias disponíveis até o momento, parece que somente a sorotipagem de *U. urealyticum* poderia dar uma maior contribuição sobre a significância de seu isolamento, a partir dos diversos materiais clínicos possíveis de serem analisados. Mais recentemente, KONG et al. (1996) aplicaram a técnica de RAPD (*Random Amplified DNA*) na tipagem desta espécie e determinaram os padrões de bandas dos produtos amplificados para os sorotipos I, III, VI, VIII, X, XI e XIV. Esta abordagem pode resultar na introdução de metodologias moleculares mais práticas para a tipagem dos isolados de *U. urealyticum*, principalmente com a expectativa de automação destas técnicas, em vias de lançamento por grandes empresas de equipamentos e produtos diagnósticos.

A detecção de micoplasmas por PCR com *primers* genéricos demonstrou uma maior freqüência de infecção no grupo de

indivíduos HIV-positivos que no grupo DST, tanto nas amostras de raspado uretral quanto nas de urina. Entretanto, não foi possível obter uma correlação destes resultados com a cultura de micoplasmas, havendo muitos falso-negativos na PCR, principalmente nas amostras de urina do grupo DST. Estas falhas podem ser devidas à eventual presença de inibidores de reação nas amostras ou a degradação do DNA durante o processo de extração. Pode ter havido também uma perda parcial de amostra durante o processamento, impossibilitando a detecção dos microrganismos, especialmente os presentes em baixas concentrações. Portanto, a aplicação direta desta técnica na detecção rotineira dos micoplasmas em amostras clínicas, sobretudo das espécies que necessitam de quantificação, em substituição às metodologias tradicionais, deve ser cuidadosamente avaliada. Como tem-se observado, a PCR necessita de padronização especial para o tipo de material clínico utilizado e o microrganismo pesquisado. Estes fatores estão dificultando, até os dias de hoje, a ampla disseminação desta metodologia nos laboratórios de rotina, para a detecção direta de vários agentes etiológicos nas amostras, o que é evidenciado pela estreita gama de opções disponíveis em kits comerciais.

Por outro lado, neste trabalho, somente a utilização da técnica da PCR possibilitou a detecção de outras espécies de micoplasmas em várias amostras, o que não foi obtido com a cultura. Utilizando *primers* específicos, foi possível confirmar a presença de espécies como *M. genitalium*, *M. fermentans*, e *M. penetrans*, difíceis de serem cultivadas e raramente isoladas diretamente de amostras clínicas. Os insucessos observados no seu isolamento, por micoplasmologistas de todo o mundo, principalmente quanto às espécies relacionadas à AIDS, podem ser devidos a inibidores de enzimas essenciais à replicação dos microrganismos eventualmente presentes nas amostras. Já foi demonstrado que a zidovudina (AZT), a dideoxiuridina, a fluorodeoxiuridina, os derivados do trimetoxibenzoato, entre outros, inibem a atividade da timidina quinase, necessária para a síntese de dTTP; e a oxifenbutazona, a 8-tioguanosina, o ácido flufenâmico, entre outros, inibem a hipoxantina-guanina-fosforibosil-

transferase, necessária na síntese de GMP (POLLACK et al., 1993). De fato, LAFEUILLADE et al. (1992) demonstraram uma substancial redução no crescimento dos micoplasmas em meio de cultura contendo AZT. Deste modo, o isolamento de espécies que eventualmente estejam infectando indivíduos HIV-positivos pode estar sendo inibido pelas drogas usadas no seu tratamento e profilaxia preventiva, atuando sobre a síntese de DNA dos micoplasmas com maiores implicações nas espécies de crescimento mais lento.

A aplicação das metodologias moleculares na detecção dos molículos possibilitou uma mudança de paradigma na importância de outras espécies na etiologia de processos patológicos, principalmente no trato urogenital, como a participação de *M. genitalium* em uretrites não gonocócicas. Em nosso estudo, a taxa de detecção desta espécie nos indivíduos do grupo DST foi de 9,1%, menor do que a relatada por outros autores (cerca de 20%), os quais classificaram-no como a terceira causa mais freqüente dessa patologia (TAYLOR-ROBINSON, 1997). Sua presença, neste trabalho, em menor freqüência nas amostras de indivíduos HIV-positivos (2,8% no total), também favorece sua associação com o processo de uretrite. Os indivíduos deste grupo aparentemente não apresentavam sinais e sintomas neste local, porém no caso de detecção positiva do microrganismo, poderia estar havendo uma infecção em estágio inicial, ou mesmo assintomática. Ainda neste grupo, sua detecção em uma amostra de urina pode também revelar não uma infecção ao nível da uretra, mas no trato urinário superior, inclusive associada ao estado de imunodepressão. Entretanto, pelo fato de ter sido observado somente em um indivíduo, sem o acompanhamento de sua evolução, a análise da significância do achado é dificultada.

A baixíssima freqüência de *M. fermentans* encontrada neste trabalho no grupo DST (uma amostra urina), e sua detecção em 5,7 % das amostras de raspado uretral dos indivíduos HIV-positivos, sugerem uma provável associação deste micoplasma com este último grupo, apesar de ter sido detectado por PCR em indivíduos HIV-negativos por alguns autores na

mesma frequência que em HIV-positivos (KATSENI et al., 1993). Porém, outros não corroboraram estes achados, tendo somente resultados negativos de sua detecção por PCR, juntamente com *M. penetrans*, em amostras de raspado uretral de indivíduos HIV-negativos, com ou sem uretrite não gonocócica (DEGUCHI et al., 1996). Nosso estudo possibilitou demonstrar sua presença em indivíduos HIV-positivos de nossa população, servindo portanto como base para uma avaliação mais cuidadosa de seu papel neste grupo. A detecção de *M. fermentans* é extremamente importante, uma vez que sua infecção pode tornar-se sistêmica, levando a processos mais graves, como nefropatias (AINSWORTH et al., 1994) e infecção dos linfonodos (SASAKI et al., 1994), diminuindo substancialmente a qualidade de vida destes pacientes.

A detecção de *M. penetrans* em amostras de urina de indivíduos HIV-positivos de nossa população é igualmente importante, não por estar envolvido diretamente na etiologia de doenças, mas por seu eventual envolvimento com a progressão da AIDS. Nossos dados de PCR confirmam sua associação com este grupo, apesar de ter sido detectado em trabalhos anteriores também em amostras de raspado uretral de indivíduos HIV-negativos (CUNHA et al., 1998). Uma vez que estes resultados podem refletir seu sítio preferencial de infecção, estes dados ainda necessitam ser confirmados.

Nossos achados, com relação à frequência de anticorpos anti- *M. penetrans*, são singularmente interessantes. Utilizando lipoproteínas de membrana (LAMP) purificadas por extração com Triton X-114, um primeiro estudo com metodologia imunoenzimática (ELISA) demonstrou anticorpos anti- *M. penetrans* em 20% de indivíduos HIV-positivos assintomáticos e 40% de indivíduos com AIDS, em comparação com 0,3% de indivíduos HIV-negativos (WANG et al., 1992). GRAU et al. (1995) estabeleceram ainda uma diferença de soropositividade para anticorpos anti- *M. penetrans* entre os indivíduos com AIDS, sendo duas vezes maior em pacientes no estágio C da doença, de acordo com a

classificação do CDC, do que no estágio A e B e duas vezes maior nos indivíduos com a relação CD4:CD8 menor que 0,30. Além disso, estes autores encontraram nos pacientes com AIDS uma soroprevalência muito maior nos homossexuais e bissexuais do que em outras categorias, ou seja, 25,8% e 3,8%, respectivamente, reafirmando que a via sexual é importante na transmissão do microrganismo (GRAU et al., 1995). Na França, a prevalência de anticorpos anti- *M. penetrans* é mais baixa em relação aos relatos anteriores, sendo 18% em indivíduos HIV-positivos, em comparação à 1,3% em indivíduos HIV-negativos (GRAU et al., 1995). Em um estudo realizado na África, foi encontrado um perfil diferente, sendo 13,5% a soroprevalência para *M. penetrans* em indivíduos HIV-positivos e 15,5% em doadores de sangue HIV-negativos; os indivíduos de ambos os grupos tinham conduta heterossexual (TUPPIN et al., 1997). Neste estudo, 25% dos indivíduos HIV-positivos com menos de 5% de células CD4 tiveram anticorpos anti-*M. penetrans*, e 8,5% de indivíduos com mais de 5% de células CD4 (TUPPIN et al., 1997). Mais recentemente, em um estudo longitudinal, no qual adultos homossexuais HIV-positivos foram acompanhados por cerca de 38 meses, GRAU et al. (1998) encontraram associação da prevalência de anticorpos anti- *M. penetrans* com o estadiamento da AIDS. Dentre os indivíduos estudados, 62% permaneceram soronegativos para *M. penetrans*, 24% demonstravam títulos de anticorpos permanentemente baixos, ou resultado negativo em algum teste, provavelmente associado com infecção latente ou crônica e 13,8% tiveram títulos de anticorpos de moderado à altos por longos períodos, indicando uma infecção ativa e persistente por *M. penetrans*. Quatro destes pacientes (50%) tiveram reativação sorológica, provavelmente desenvolvendo uma infecção aguda durante o estudo. O número de células CD4+ diminuiu significativamente mais rápido no último grupo, que nos indivíduos sem anticorpos anti-*M. penetrans*, o mesmo comportamento observado no grupo de indivíduos com baixos títulos de anticorpos. Nos indivíduos que tiveram reativação sorológica, a carga viral foi maior nos soros dos indivíduos com maiores títulos de anticorpos anti- *M. penetrans*. Estes dados sugerem uma

associação da infecção ativa por *M. penetrans* com a progressão da AIDS (GRAU et al., 1998).

Nossos resultados indicam um perfil de anticorpos anti-*M. penetrans* nos indivíduos HIV-positivos semelhante ao encontrado na Europa e Estados Unidos. Entretanto, os resultados obtidos no grupo de indivíduos HIV-negativos com queixa de uretrite (17,3% para IgG), são semelhantes aos encontrados em indivíduos HIV-negativos na África (15,5%) (TUPPIN et al., 1997), e maiores que os observados por WANG et al. (1993), que encontraram uma taxa de 0,9% em indivíduos com DST, segundo o autor, sem risco específico para infecção pelo HIV. Considerando os resultados do grupo utilizado para o cálculo do limite de reatividade do ELISA, nossa taxa de 1,2% para IgG é semelhante às observadas por outros autores em grupos controle nos Estados Unidos e Europa (0,3-1,3%) (WANG et al., 1992; GRAU et al., 1995).

Nossa abordagem, avaliando diferentes isótipos de imunoglobulinas anti-*M. penetrans*, pode vir a oferecer estratégias adicionais para a compreensão da participação deste microrganismo no desenvolvimento da imunodeficiência. Deste modo, principalmente a pesquisa de IgA, que assim como IgG, apresenta taxas maiores no grupo HIV e DST em comparação com os controles, pode dar melhores indicações da fase em que se encontra a infecção pelo microrganismo. Apesar de não haver diferenças estatísticas, as taxas de IgM anti-*M. penetrans* encontradas no grupo de indivíduos HIV- negativos são um pouco maiores, onde, pelos relatos anteriores, esperar-se-ia uma menor exposição à esta espécie. Isto pode ser devido ao fato de serem pacientes com queixa de DST, portanto sujeitos à uma série de microrganismos patogênicos para o trato urogenital, incluindo outras espécies de micoplasmas. Desta forma, pela própria característica da resposta imune humoral inicial, que produz anticorpos de menor especificidade e afinidade contra o agente invasor em relação à uma fase mais tardia, estes anticorpos detectados podem ser de reatividade cruzada, pela natureza do antígeno empregado: um extrato bruto de lipoproteínas de membrana.

Ao contrário do que poderíamos esperar, a correlação desta soroprevalência com os dados da contagem de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ não apresentou diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos isótipos estudados. Isto provavelmente é devido ao pequeno número de indivíduos dos quais foi possível obter os resultados de CD4/CD8 (50), sendo 30 com a relação menor que 0,3, e 20 com a relação maior ou igual que 0,3. Nossos resultados são parcialmente discordantes dos relatados por GRAU et al. (1995). Encontramos praticamente o dobro de positividade de anticorpos da classe IgG anti- *M. penetrans*, nos indivíduos HIV- positivos com relação CD4: CD8 maior ou igual à 0,3. Por outro lado, com relação ao isótipo IgA, a frequência destes anticorpos foi quatro vezes maior nos indivíduos com relação menor que 0,3 (20% contra 5 %), e quanto à IgM, não foi observada sua presença nos indivíduos com relação maior ou igual que 0,3, sendo encontrada em 10 % dos indivíduos com relação menor que 0,3. Estes resultados parecem concordar com os últimos achados de GRAU et al. (1998). A presença de IgM e IgA anti- *M. penetrans* pode ser um indicador de uma infecção recente ou ativa pelo microrganismo, notadamente nos indivíduos HIV-positivos com uma relação CD4: CD8 mais baixa. Deste modo, pode-se especular que esteja realmente havendo a participação, apesar de incerta, de uma infecção ativa por *M. penetrans* no processo de destruição das células CD4 dos indivíduos HIV- positivos.

Com relação às análises dos soros dos indivíduos por Imunoblot para *M. penetrans*, GRAU et al. (1995) causaram certa confusão chamando as proteínas imunodominantes do microrganismo de 38 e 42 kD e sugeriram que as amostras de soro positivas por ELISA deveriam ser confirmadas pela reatividade da proteína de 38 kD. Estes autores demonstraram ser a proteína de 38 kD específica para *M. penetrans*, havendo reação cruzada com a proteína de 42 kD com alguns soros humanos contendo anticorpos anti- *M. pneumoniae* e *U. urealyticum* (GRAU et al., 1995). Anteriormente, WANG et al. (1992) haviam encontrado as proteínas mais reconhecidas por imunoblot pelos soros positivos pelo teste de ELISA, com cerca de 35 e 38 kD. Entretanto, estas parecem ser as

mesmas relatados por GRAU et al. (1995) apresentando 38 e 42 kD, respectivamente, sendo estas diferenças provavelmente devidas ao protocolo utilizado por cada grupo (BRENNER et al., 1996). Nossos dados não corroboram a afirmação de GRAU et al. (1995). Demonstramos que pode haver reação no Imunoblot com a proteína de 38 kD de *M. penetrans*, com amostras de soro de indivíduos soronegativos para este microrganismo por ELISA, infectados por *M. pneumoniae* e *M. hominis*. A escolha destas espécies deveu-se ao fato de estarem incluídas, assim como *M. penetrans*, no mesmo grupo filogenético (BEHBAHANI et al., 1993), de onde, por similaridades antigênicas, poderia-se esperar uma maior probabilidade de reatividade cruzada. Além disso, somente a metade das amostras positivas por ELISA reconheceram o peptídeo de 38 kD por imunoblot, sem diferença entre os dois grupos de indivíduos para os três isótipos testados. Este reconhecimento foi inclusive um pouco maior para IgA no grupo de indivíduos HIV-positivos (75%), portanto esta falta de reconhecimento não pode ser atribuída à uma eventual falha na resposta imune por parte destes indivíduos.

Analisando de uma maneira global, nos indivíduos HIV-positivos, *M. hominis* e *U. urealyticum* foram responsáveis por taxas de infecção de 26,4% neste grupo, e de 14,5% nos indivíduos do grupo DST. No primeiro, a taxa de 15,1% de infecção pelas espécies de micoplasma consideradas emergentes (2,8% para *M. genitalium*, 5,7% para *M. fermentans*, e 6,6% para *M. penetrans*), detectados por PCR, não é de maneira alguma desprezível. Estes resultados mostram que há muito por se conhecer a respeito do papel destas espécies nestes pacientes, principalmente aquelas relacionadas à AIDS. Do mesmo modo, uma taxa de 10% de infecção por micoplasmas emergentes em indivíduos com DST, sendo 9,1% para *M. genitalium* e 0,9% para *M. fermentans*, mostra também novos caminhos para a pesquisa de possíveis agentes etiológicos em patologias do trato geniturinário, uma vez que estas espécies não são pesquisadas nos laboratórios de rotina. Desta maneira, esperamos estar contribuindo, com este trabalho, para a contemplação de um novo panorama

dentro do conhecimento das micoplasmoses humanas no Brasil, ainda tão pouco estudadas no país, porém de inegável importância, como demonstram inúmeras publicações internacionais.

Este estudo abrangeu a detecção de diferentes espécies de micoplasmas, algumas das quais descobertas muito recentemente, através do emprego de técnicas microbiológicas, sorológicas e de biologia molecular. Esta abordagem, além ter sido realizada em diferentes materiais clínicos, é inédita e original no Brasil. A análise dos dados em pacientes HIV-positivos e negativos permitiu fornecer mais um subsídio na elucidação do papel destes micoplasmas nestes indivíduos, e contribuir com mais um dado na literatura de um país com alta prevalência de infecção pelo HIV.

CONCLUSÕES

6.-CONCLUSÕES

- As espécies emergentes de micoplasmas estão presentes em nossa população em taxas significativas, quando comparadas à *M. hominis* e *U. urealyticum*, sendo que, conforme esperado, *M. genitalium* infecta principalmente indivíduos com uretrite, e *M. fermentans* e *M. penetrans* infectam principalmente indivíduos HIV- positivos;
- A técnica da PCR constitui-se ainda a metodologia mais eficaz para a detecção das espécies de crescimento mais difícil, apesar de não ter apresentado uma boa correlação com a cultura de espécies como *M. hominis* e *U. urealyticum*;
- Os isolados de *Ureaplasma urealyticum* distribuíram-se igualmente quanto aos grupos de patogenicidade, nos dois grupos de pacientes estudados;
- O perfil da soroprevalência de *M. penetrans* em nossa população mostrou taxas de IgG e IgA semelhantes nos indivíduos HIV- positivos e HIV- negativos com DST, sendo maiores em comparação aos controles;
- Ao contrário da afirmação de alguns autores, o peptídeo imunodominante de 38 kD de *M. penetrans* não se mostrou útil na confirmação da detecção de anticorpos séricos por ELISA, o que faz necessário maiores estudos para o aprimoramento destes testes sorológicos.

6.- REFERÊNCIAS¹

- AINSWORTH, J.G., HOURSHID, S., CLARKE, J., MITCHEL, D., WEBER, J.N., TAYLOR-ROBINSON, D. Detection of *Mycoplasma fermentans* in HIV-positive individuals undergoing bronchoscopy. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE INTERNATIONAL ORGANISATION FOR MYCOPLASMOLOGY, 10., Bordeaux, 1994. **Programme and abstracts**. Bordeaux, IOM, 1994. p.319-320. (IOM Letters, v.3).
- AINSWORTH, J.G., KATSENI, V., HOURSHID, S., WALDRON, S., BALL, S., CATTELL, V., TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma fermentans* and HIV-associated nephropathy. **J. Infect.**, London, v.29, n.3, p.323-326, 1994.
- ALFA, M.J., EMBREE, J.E., DEGAGNE, P., OLSON, N., LERTZMAN, J., MACDONALD, K.S., MACDONALD, N.T., HALL, P.F. Transmission of *Ureaplasma urealyticum* from mothers to full and preterm infants. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v.14, n.5, p.341-345, 1995.
- BARBEYRAC, B., BÉBÉAR, C., TAYLOR-ROBINSON, D. PCR: preparation of DNA from clinical specimens. In: TULLY, J.G., RAZIN, S. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. Diagnostic procedures. San Diego: Academic Press, 1996. v.2, p.61-64.

¹ De acordo com a norma NBR 6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1994.

- BARILE, M.F. DNA homologies and sorologic relationships among ureaplasmas from various hosts. **Pediatr. Infect. Dis.**, Baltimore, v.5, n.6, p.296-299, 1986.
- BASEMAN, J.B., DALLO, S.F., TULLY, J.G., ROSE, D.L. Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, p.2266-2269, 1988.
- BEHBAHANI, N., BLANCHARD, A., CASSELL, G.H., MONTAGNIER, L. Phylogenetic analysis of *Mycoplasma penetrans*, isolated from HIV-infected patients. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.109, p.63-66, 1993.
- BLANCHARD, A. *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of UGA tryptophan codon. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.4, n.4., p.669-676, 1990.
- BLANCHARD, A. Mycoplasmas and HIV infection, a possible interaction through immune activation. **Wien. Klin. Wochenschr.**, Viena, v.109, n.14-15, p.590-593, 1997.
- BORDET, J. La morphologie du microbe de la péripneumonie. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.24, p.161-167, 1910.
- BORREL, DUJARDIN-BEAUMETZ, JEANET, JOUAN. Le microbe de la péripneumonie. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.24, p.168-179, 1910.
- BRIDÉ, J., DONATIEN, A. Le microbe de la lágaxie contagieuse du mouton et de la chèvre. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.39, p.925-951, 1925.
- BRENNER, C., NEYROLLES, O., BLANCHARD, A. Mycoplasmas and HIV infection: from epidemiology to their interaction with immune cells. **Front. Biosci.**, Tampa, v.1, p. 42-554, 1996.

- BRUS, F., WAARDE, W.M., SCHROOTS, C., OETOMO, B.S. Fatal ureaplasma pneumonia and sepsis in a newborn infant. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.150, p.782-783, 1991.
- BURDGE, D.R., REID, G.D., REEVE, C.E., ROBERTSON, J.A., STEMKE, G.W., BOWIE, W.R. Septic arthritis due to dual infection with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. **J. Rheumatol.**, Toronto, v.15, p.366-368, 1988.
- CASSEL, G.H., DAVIS, R.O., WAITES, K.B. Isolation of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from amniotic fluid at 16-20 weeks of gestation: potential effect on outcome of pregnancy. **Sex. Transm. Dis.**, Philadelphia, v.10, suppl.30, p.294-302, 1983.
- CASELL, G.H., YANEZ, A., DUFFY, L.B. Detection of *Mycoplasma fermentans* in the respiratory tract of children with pneumonia. AINSWORTH, J.G., HOURSHID, S., CLARKE, J., MITCHEL, D., WEBER, J.N., TAYLOR-ROBINSON, D. Detection of *Mycoplasma fermentans* in HIV-positive individuals undergoing bronchoscopy. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF THE INTERNATIONAL ORGANISATION FOR MYCOPLASMOLOGY, 10., Bordeaux, 1994. **Programme and abstracts**. Bordeaux, IOM, 1994. p.456. (**IOM Letters**, v.3).
- CHANG, Y., CESARMAN, E., PESSIN, M., LEE, F., CULPEPPER, J., KNOWLESS, D. Identification of herpes-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science**, Washington, v.266, p.1865-1869, 1994.
- CHANOCK, R.M., HAYFLICK, L., BARILE, M.F. Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.48, p.41-49, 1962.

CHANOCK, R.M, DIENNES, L., EATON, M.D., EDWARD, D.G.ff., FREUND, E.A., HAYFLICK, L., HERS, J.F., JENSEN, K.E., LIU, C., MARMION, B.P., MORTON, H.E., MUFSON, M.A., SMITH, P.F., SOMERSON, N.L., TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma pneumoniae*: Proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton-Agent). **Science**, Washington, v.140, p.662, 1963.

CHOWDHURY, I.H., MUNAKATA, T., KOYANAKI, Y., KOBAYASHI, S., YAMAMOTO, N. Mycoplasma can enhance HIV replication in vitro: a possible cofactor responsible for the progression of AIDS. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.170, p.1365-1370, 1990.

CRACEA, E., BOTEZ, D., CONSTATINESU, S., BRAILA, M.G. *Ureaplasma urealyticum* serotypes isolated from cases of female sterility. **Yale J. Biol. Med.**, New Haven, v.57, p.895, 1984.

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.

CUNHA, R.A.F., TAKEI, K., VAZ, A.J., ROSENTHAL, C. Detection of mycoplasmas in urethral swabs from HIV-1 infected patients and control individuals using culture techniques and polymerase chain reaction. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.40, n.1, p.1-5, 1998.

DAWSON, M.S., HAYES, M.M, WANG, R.Y.-H., ARMSTRONG, D., KUNDSIN, R.B., LO, S.-C. Detection and isolation of *Mycoplasma fermentans* from urine of human immunodeficiency virus type-1-infected patients. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.117, p.511-514, 1993.

- DEGUCHI, T., GILROY, C.B., TAYLOR-ROBINSON, D. Failure to detect *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans* and *Mycoplasma pirum* in the urethra of patients with acute nongonococcal urethritis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v.15, p.169-171, 1996.
- DIENES, L., EDSALL, G. Observations on the L-organism of Klienenger. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, New York, v.36, p.740-744, 1937.
- DUSSURGET, O., HENRY, A., LEMERCIER, B., ROULLAND-DUSSOIX, D. Polymerase chain reaction-based diagnosis of mollicute infection of commercial animal sera. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v.20, p.125-135, 1994.
- EATON, M.D., MEIKLEJOHN, G. van HERICK, W. Studies on the ethiology of primary atypical pneumonia. A filtrable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chicken embryos. **J. Exp. Med.**, New York, v.79, p.649-668, 1944.
- EDWARD, D.G. A suggested classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. **Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.**, Washington, v.5, n.2, p.85-93, 1955.
- EDWARD, D.G., FREUND, E.A. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. **J. Gen. Microbiol.**, Colchester, v.14p.197-207, 1956.
- EDWARD, D.G., FREUND, E.A. Proposal for *Mollicutes* as a name of the class established for the order *Mycoplasmatales*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.17, n.3, p.267-268, 1967.
- FOSTER, J.P. Some historical notes on contagious Pleuro-Pneumonia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Chicago, v.1, p.918-922, 1934.

- FOY, H.M. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.S37-46, 1993.
- GAYNOR, R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. **AIDS**, Philadelphia, v.6, p.347-363, 1992.
- GOULET, M., DULAR, R., TULLY, J.G., BILLOWES, G., KASATIYA, S. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, p.2823-2825, 1995.
- GRAU, O., KOVACIC, R., GRIFFAIS, R., LAUNAY, V., MONTAGNIER, L. Development of PCR-based assays for the detection of two human mollicute species, *Mycoplasma penetrans* and *M. hominis*. **Mol. Cell. Probes**, London, v.8, p.139-148, 1994.
- GRAU, O., SLIZEWICZ, B., TUPPIN, P., LAUNAY, V., BOURGEOIS, E., SAGOT, N., MOYNIER, M., LAFEUILLADE, A., BACHELEZ, H., CLAUVEL, J.P., BLANCHARD, A., BAHRAOUI, E., MONTAGNIER, L. Association of *Mycoplasma penetrans* with Human Immunodeficiency Virus infection. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.172, p.672-681, 1995.
- GRAU, O., TUPPIN, P., SLIZEWICZ, B., LAUNAY, V., GOUJARD, C., BAHRAOUI, E., DELFRAISSY, J.F., MONTAGNIER, L. A longitudinal study of seroreactivity against *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected homosexual men: association with disease progression. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, New York, v. 14 n. 8, p.661-667, 1998.
- HALLER, M., FORST, H., RUCKDESCHEL, G., DENECKE, H., PETER, K. Peritonitis due to *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in a liver transplant recipient. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v.10, p.172, 1991.

HAY, P.E., MORGAN, D.J., ISON, C.A. A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy. **Br. J. Obstet. 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 birth weight infants. **J. Pediatr.**, St. Louis, v.24, n.6, p.956-961, 1994.

HOROWITZ, S., MAZOR, M., HOROWITZ, J., PORATH, A., GLEZERMAN, M. Antibodies to *Ureaplasma urealyticum* in women with intraamniotic infection and adverse pregnancy outcome. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, Copenhagen, v.74, n.2, p.132-136, 1995.

IYAMA, K., ONO, S., KUWANO, K., OHISHI, M., SHIGUEMATSU, H., ARAI, S. Induction of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) and enhancement of HIV-1 replication in the J22HL60 cell line by *Mycoplasma penetrans*. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v.40, n.12, p.907-914, 1996.

JENSEN, J.S., HANSEN, H.T., LIND, K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, p.2862-91, 1996.

JORUP-RONSTROM, C., AHL, T., HAMMARSTRÖM, L., SMITH, C.I.E., RYLANDER, M., HALLANDER, H. Septic osteomyelitis and polyarthrititis with *Ureaplasma* in hypogamaglobulinemia. **Infection**, Munich, v.17, p.301-303, 1989.

KATSENI, V.L., GILROY, C.B., RIAYT, B.K., ARIYOSHI, K., BIENIASZ, P.D., WEBER, J.N. *Mycoplasma fermentans* in individuals seropositive and seronegative for HIV-1. **Lancet**, London, v.341, p.271-273, 1993.

- KOCH, A., BILINA, A., TEODOROWICZ, L., STARY, A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. **Wien. Klin. Wochenschr.**, Viena, v.109, n.14-15, p. 584-589, 1997.
- KONG, F., ZHU, X., ZHOU, J. Grouping and typing of *Ureaplasma urealyticum*. **Chung-hua I Hsueh Tsa Chih, Ying Wen Pan**, Beijing, v.76, n.2, p.138-140, 1996.
- KOVACIC, R.; LAUNAY, V.; TUPPIN, P. LAFEUILLADE, A.; FEUILLIE, V.; MONTAGNIER, L.; GRAU, O. Search for the presence of six *Mycoplasmas* species in peripheral blood mononuclear cells of subjects seropositive and seronegative for Human Immunodeficiency Virus. **J.Clin.Microbiol.** **34**(7): 1808-10, 1996.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LAFEUILLADE, A., PAPIETOK, G., PAUTRAT, G., ESCARGUEL, C., PELLEGRINO, P., QUILICHINI, R. In vitro activity of zidovudine against mycoplasma. **Lancet**, London, v.339, p.131, 1992.
- LAMONT, R.F., TAILOR-ROBINSON, D., WIGGLESWORTH, J.S., FURR, P.M., EVANS, R.T., ELDER, M.G. The role of mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydiae in the genital tract of women presenting in spontaneous early preterm labour. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.24, p.253-257, 1987.
- LEMAÎTRE, M., HENIN, Y., DESTOUESSE, C., FERRIEUX, L., MONTAGNIER, L., BLANCHARD, A. Role of mycoplasma infection in the cytopathic effect induced by human immunodeficiency virus type 1 in infected cell lines. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, p.742-748, 1992.

- LIND, K., KRISTENSEN, G.B. Significance of antibodies to *Mycoplasma genitalium* in salpingitis. **Eur. J. Clin. Microbiol.**, Wiesbaden, v.6, p.205-207, 1987.
- LO, S.-C., SHIH, J.W.-K., YANG, N.Y., OU, C.Y., WANG, Y.-H. A novel virus-like infectious agent in patients with AIDS. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.40, p.213-226, 1989a.
- LO, S.-C., DAWSON, M.S., WONG, D.M., NEWTON, I.P.B., SONODA, M.A., ENGLER, W.F. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients with AIDS: an immunohistochemical, *in situ* hybridization and ultrastructural study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.41, p.601-616, 1989b.
- LO, S.-C., HAYES, M.M., WANG, R.Y.-H., PIERCE, P.F., KOTANI, H., SHIH, J.W.-K. Newly discovered mycoplasma isolated from patients with HIV. **Lancet**, London, v.338, p.1415-1418, 1991.
- LO, S.-C., HAYES, M.M., TULLY, J.G., WANG, R.Y.-H., KOTANI, H., PIERCE, P.F., ROSE, D.L., SHIH, J.W.-K. *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.42, n.3, p.357-64, 1992.
- LO, S.-C., WEAR, D.J., GREEN, S.L., JONES, P.G., LEGIER, J.F. Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infections due to *Mycoplasma fermentans*. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.S259-263, 1993.
- MEYER, R.D., CLOUGH, W. Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults: emphasis on immunosuppression. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.S243-249, 1993.

- MOLLER, B.R., TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P.M. Serological evidence implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. **Lancet**, London, v.1, p.1102-1103, 1984.
- MOLLER, B.R., TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P.M., TOFT, B., ALLEN, J. Serological evidence that chlamidia and micoplasmas are invoved in infertility of women. **J. Reprod. Fertil.**, Oxford, v.73, p.237-240, 1985.
- MÖLLER, B.R., HERRMAN, B., IBSEN, H.H., HALKIER-SÖRENSEN, L., FROM, E., MARDH, P.A. Occurrence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in non-gonococcal urethritis before and after treatment in a double-blind trial of ofloxacin versus erytromycin. **Scand. J. Infect. Dis., Suppl.**, Stockholm, v.68, p.31-34, 1990.
- MONTAGNIER, L., BLANCHARD, A. Mycoplasmas as co-factors in infection due to the human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.S309-315, 1993.
- NAESSENS, A., FOULON, W., BREYNAERT, J., LAUWERS, S. Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* isolated from normal pregnant women and patients with pregnancy complications. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, p.319-322, 1988.
- NEYROLLES, O., BRENNER, C., PREVOST, M.C., FONTAINE, T., MONTAGNIER, L., BLANCHARD, A. Identification of two glycosylated components of *Mycoplasma penetrans*: a surface-exposed capsular polysaccharide and a glycolipid fraction. **Microbiology**, Philadelphia, v.144, p.1247-1255, 1998.
- NIR-PAZ, R., ISRAEL, S., HONIGMAN, A., KAHANE, I. Mycoplasmas regulate HIV-LTR-dependent gene expression. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.128, p.63-68, 1995.

NOCARD, E., ROUX, E. Le microbe de la péripneumonie. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.12, p.240-262, 1898.

NOWAK, J. Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la péripneumonie des bovidés. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, v.43, p.1330-1352, 1929.

OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reaction in gels. **Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B: Microbiol.**, Copenhagen, v.26, p.507-515, 1949.

POLLACK, J.D., JONES, M.A., WILLIAMS, M.V. The metabolism of AIDS-associated mycoplasmas. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.S267-271, 1993.

QUINN, P.A., RUBIN, S., NOCILLA, D.M. Serological evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in neonatal respiratory disease. **Yale J. Biol. Med.**, New Haven, v.56, p.565-572, 1983.

ROBERTSON, J.A., HONORÉ, L.H., STEMKE, G.W. Serotypes of *Ureaplasma urealyticum* in spontaneous abortion. **Pediatr. Infect. Dis.**, Baltimore, v.5, p.270-272, 1986.

ROBERTSON, J.A., VEKRIS, A., BEBEAR, C., STEMKE, G.W. Polymerase Chain Reaction using 16S rRNA gene sequence distinguishes the two biovars of *Ureaplasma urealyticum*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.4, p.824-830, 1993.

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

SABIN, A.B. The filtrable mocrorganisms of the pleuropneumonia group. **Bacteriol. Rev.**, Baltimore, v.5, n.1, p.1-66, 1941.

SAILLARD, C., CARLE, P., BOVÉ, J., BÉBÉAR, C., LO, S.-C., SHIH, J.-K. Genetic and serologic relatedness between *Mycoplasma fermentans* strains and a mycoplasma recently identified in tissues of AIDS and non-AIDS patients. **Res. Virol.**, Paris, v.141, p.385-395, 1990.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p.6.1-6.2.

SASAKI, T., SASAKI, Y., KITA, M., SUZUKI, K., WATANABE, H., HONDA, M. Evidence that Lo's Mycoplasma (*Mycoplasma fermentans incognitus*) is not a unique strain among *Mycoplasma fermentans* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, p.2435-2440, 1992.

SASAKI, Y., HONDA, M., NAITOU, M., SASAKI, T. Detection of Mycoplasma fermentans DNA from lymph nodes of acquired immunodeficiency syndrome patients. **Microb. Pathog.**, London, v.17, n.2, p.131-135, 1994.

SETERFIT, L.B. Preparation of antigens and antisera. In: RAZIN, S., TULLY, J.G. **Methods in mycolplasmology**. New York: Academic Press, 1983. v.1, p.401-404.

SHAEVERBEKE, T., GILROY, C.B., BÉBÉAR, C., DEHAIS, J., TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma fermentans* in joints of patients with rheumatoid arthritis and other joint disorders. **Lancet**, London, v.347, p.1418, 1996.

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

SHEPARD, M.C., LUNCEFORD, C.D. Diferencial agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T Mycoplasma) in primary cultures of clinical material. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.3, n.6, p.613-625, 1976.

TAY, Y.K., GOH, C.L., CHAN, R.K., LING, A.E. Dual therapy with doxycycline and ketoprofen compared to doxylxycline in the treatment of uncomplicated non-gonococcal urethritis. **Ann. Acad. Med. Singapore**, Singapore, v.24, n.4, p.519-522, 1995.

TAYLOR-ROBINSON, D., CSONKA, G.W., PRENTICE, M.J. Human intra urethral inoculation of ureaplasmas. **Q. J. Med.**, Oxford, v.46, n.183, p.309-326, 1977.

TAYLOR-ROBINSON, D. The Harrison Lecture. The history and role of *Mycoplasma genitalium* in sexually transmitted diseases. **Genitourin. Med.**, London, v.71, p.1-8, 1995.

TAYLOR-ROBINSON, D. Infections due to *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. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego: Academic Press, 1996b. v.2, p.225-236.

- TAYLOR-ROBINSON, D. Genital mycoplasma infections. **Wien. Klin. Wochenschr.**, Viena, v.109, n.14-15, p.578-583, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON, D., GILROY, C.B., HAY, P.E. Occurrence of *Mycoplasma genitalium* in different populations and its clinical significance. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.S66-68, 1993.
- TAYLOR-ROBINSON, D., MUNDAY, P.E. Mycoplasmal infection of the female genital tract and its complications. In: HARE, M.J., ed. **Genital Infections in women**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1988. p.228-247.
- TAYLOR-ROBINSON, D., AINSWORTH, J. Antibodies to *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected patients. **Lancet**, London, v.341, p.557-558, 1993.
- TOWBIN, H., GORDON, J. Immunoblotting and dot-immunoblotting - Current status and outlook. Review article. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.72, p.313-340, 1979.
- TULLY, J.G., TAYLOR-ROBINSON, D., COLE, R.M., ROSE, D.L. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **Lancet**, London, v.1, p.1288-1291, 1981.
- TUPPIN, P., DELAMARE, O., LAUNAY, V., GUEGUEN, M., SAMBA, M.C., PAMBOU, L., MONTAGNIER, L., GRAU, O. High prevalence of antibodies to *Mycoplasma penetrans* in human immunodeficiency virus-seronegative and seropositive populations in Brazzaville, Congo. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.4, n.6, p.787-788, 1997.
- VELLECA, W.M., BIRD, B.R., FORRESTER, F.T. Complete media for growth of mycoplasmas and ureaplasmas from the urogenital tract: arginine broth medium for growth of *M. hominis*. In: VELLECA, W.M., BIRD,

B.R., FORRESTER, F.T. **Laboratory diagnosis of mycoplasma infections**: course 8226-C. Atlanta: U.S. Department of Health, Education and Welfare, C.D.C., s.d. p.120. [Apêndice].

WANG, R.Y.-H., SHIH, J.W.-K., GRANDINETTI, T., PIERCE, P.F., HAYES, M.M., WEAR, D., ALTER, H.J., LO, S.-C. High frequency of antibodies to *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected patients. **Lancet**, London, v.340, p.1312-1316, 1992.

WANG, R.Y.-H., SHIH, J.W.-K., WEISS, S., GRANDINETTI, T., PIERCE, P.F., LANGE, M., ALTER, H.J., WEAR, D.J., DAVIES, C.L., MAYUR, R.K. *Mycoplasma penetrans* in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's Sarcoma. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.724-729, 1993.

WHITHBY, D., HOWARD, M., TENAT-FLOWERS, M., BRINK, N., COPAS, A., BOSHOF, C. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. **Lancet**, London, v.346, p.799-802, 1995.

ZHENG, X., WATSON, H.L., WAITES, K.B., CASSEL, G.H. Serotype diversity and antigenic variation among invasive isolates of *Ureaplasma urealyticum* from neonates. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, p.3472-3474, 1992.

ANEXOS

ANEXO 1 - Meios de cultura utilizados :

Meio Líquido SP-4 (TAYLOR-ROBINSON, 1996b, mod.):

• PPLO Broth (Difco)	0,35 g
• Triptona (Difco)	1,00 g
• Bacto-Peptona (Difco)	0,53 g
• H ₂ O bidestilada	61,6 mL

O pH do meio foi ajustado para 7,5 com NaOH 1N, e o meio autoclavado à 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, o meio foi suplementado, de maneira estéril, com:

• Vermelho de Fenol 1%	0,4 mL
• Meio Fisher c/ bicarb.(Sigma)	5,0 mL
• Extrato fresco de levedura 25%	3,5 mL
• Yeastolate 2% (Difco)	10,0 mL
• Soro fetal bovino (Gibco)	17,0 mL
• Penicilina G Potássica	1.000 UI/mL
• Dextrose 50%(Difco)	2,0 mL
• Arginina 1% (Difco)	1,0 mL

-para o meio SP-4 sólido foi adicionado 1,0 g de Ágar Noble antes da autoclavação.

Meio de Transporte A_{3XB} (SHEPARD, 1976, mod.):

• Tryptic Soy Broth (Difco)	3,0 g
• Cloridrato de L-cisteína 4%	0,25 mL
• H ₂ O bidestilada	98 mL

O meio foi autoclavado à 121 °C por 15 minutos, e após resfriamento, suplementado de maneira estéril com:

• Fração de soro PPLO	1,0 mL
• Anfotericina B	2,5 µg/mL
• Penicilina G	1.000 UI/mL

Meio Líquido U 10 (SHEPARD, 1974, mod.):

• PPLO Broth (Difco)	1,47 g
• H ₂ O bidestilada	70 mL

O pH do meio foi ajustado p/ 5,5 com NaOH 1 N, seguido de autoclavação à 120 °C por 15 minutos, e resfriamento, suplementado de maneira estéril com:

- Soro estéril e inativado de cavalo (Sigma) 20 mL
- Extrato fresco de levedura 25% 10 mL
- Cloridrato de L-cisteína 2% 0,5 mL
- Uréia 10% (Difco) 0,5 mL
- Suplemento VX (Difco) 1,0 mL
- Penicilina G 1.000 UI/mL
- Vermelho de Fenol 1% 0,1mL
- Suplemento GHL (Sigma) 0,1mL

Meio líquido de Arginina (VELLECA, 1979, mod.):

- PPLO Broth (Difco) 1,4 g
- H₂O bidestilada 70 mL

O meio foi autoclavado à 120 °C por 15 minutos, e após resfriamento, suplementado de maneira estéril com:

- Soro estéril e inativado de cavalo 20 mL
- Extrato fresco de levedura 25% 10 mL
- Suplemento VX (Difco) 1,0 mL
- Vermelho de Fenol 0,4% 0,3 mL
- Penicilina G 1.000 UI/mL
- Arginina 30% 0,66 mL

Meio sólido A7 (SHEPARD, 1976, mod.):

- PPLO Broth (Difco) 2,1 g
- MnSO₄•H₂O 0,0150 g
- H₂O bidestilada 63 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,5-6,0, foi adicionado 1,0 g de Ágar Noble (Difco), seguido de autoclavação à 120 °C por 15 minutos, e suplementado de maneira estéril com:

- Soro estéril e inativado de cavalo 20 mL
- Extrato fresco de levedura 25% 10 mL
- Uréia 10% (Difco) 1,0 mL
- Glicose 10% (Difco) 5 mL
- Suplemento VX (Difco) 1,0 mL
- Penicilina G 1.000 UI/mL

ANEXO 2 – Relação dos indivíduos do grupo HIV-positivo, com as D.O.s obtidas no teste de ELISA, os resultados do Imunoblot e PCR para *M. penetrans*, e da contagem das células CD4 e CD8.

Nº	cultura	PCR p/ <i>M. penetrans</i>		ELISA			Imunoblot			CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8
		urina	raspado	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA			
01	neg	-	+	0,18	0,13	0,06						
02	neg	-	+	0,14	0,05	0,05						
03	neg	-	+	0,20	0,04	0,06						
04	neg	-	-	0,23	0,02	0,07	neg					
05	neg	-	-	0,30	0,05	0,06	neg					
06	neg	-	-	0,05	0,01	0,03						
07	neg	-	-	0,16	0,20	0,05						
08	neg	-	-	0,12	0,03	0,05						
09	neg	-	-	0,10	0,03	0,09						
10	neg	-	-	0,15	0,04	0,05						
11	neg	-	-	1,83	0,22	0,15	38		38			
12	neg	-	-	0,51	0,06	0,06	neg					
13	neg	-	-	0,93	0,05	0,13	38		38			
14	neg	-	+	0,79	0,04	0,48	neg		38			
15	neg	-	-	0,25	0,02	0,04	neg					
16	neg	-	-	0,31	0,13	0,07	neg					
17	neg	-	-	3,41	0,30	0,12	38		38			
18	neg	-	+	0,23	0,15	0,06	38					
19	neg	-	-	0,14	0,08	0,06						
20	neg	-	-	0,24	0,03	0,05	neg					
21	neg	-	+	0,11	0,03	0,04						
22	neg	-	+	0,38	0,21	0,05	38					
23	neg	-	-	0,08	0,08	0,04						
24	Uu ² 10 ³	-	-	0,40	0,03	0,81	38		38			
25	neg	-	-	0,22	0,10	0,32			neg			
26	neg	-	-	0,24	0,07	0,06	neg					
27	Uu 10 ³	-	-	0,19	0,01	0,09						
28	neg	-	-	0,07	0,02	0,02						
29	neg	-	-	0,07	0,28	0,16			neg			
30	neg	-	-	0,12	0,01	0,11			38			
31	neg	-	-	0,14	0,06	0,07						
32	neg	-	-	0,19	0,06	0,08						
35	Neg	-	-	0,18	0,02	0,14			38			

² Uu = *Ureaplasma urealyticum*; Mh: *Mycoplasma hominis*; 10^x: CCU/mL

36	Neg	-	-	0,14	0,13	0,09						
37	Neg	-	-	0,34	0,05	0,07	38					
38	Neg	-	-	0,14	0,06	0,14			38			
39	Neg	-	-	0,16	0,02	0,05						
40	Uu 10 ³	-	-	0,05	0,02	0,07						
47	neg	-	-	0,01	0,09	0,03				1,9	77,2	0,1
48	neg	-	-	0,00	0,01	0,02				1,0	75,5	0,1
49	neg	-	-	0,01	0,07	0,02				5,8	77,5	0,1
50	neg	-	-	0,02	0,07	0,02						
51	Uu 10 ³	-	-	0,08	0,03	0,02				9,4	68,7	0,1
52	Uu 10 ³	-	-	0,14	0,03	0,02				3,0	80,3	<0,1
53	neg	-	-	0,06	0,11	0,23			neg	13,8	71,3	0,2
54	Uu 10 ³	-	-	0,02	0,02	0,16			38	5,4	74,8	0,1
55	UU 10 ³	-	-	0,03	0,05	0,25			neg	22,3	63,5	0,3
56a	neg	-	-	0,00	0,25	0,03				10,3	53,4	0,2
57a	neg	-	-	0,03	0,06	0,02				21,7	59,2	0,4
58	Uu>10 ⁵ Mh 10 ⁵	-	-	0,02	0,03	0,03				15,4	60,9	0,2
59	Uu 10 ⁵	-	-	0,05	0,04	0,02				17,5	65,3	0,3
60	neg	-	-	0,03	0,12	0,02				14,2	62,2	0,2
61	neg	-	-	0,18	0,13	0,02				13,2	69,9	0,2
62	Uu 10 ⁴ Mh 10 ⁵	-	-	0,08	0,15	0,02				22,7	59,1	0,4
63	neg	-	-	0,05	0,06	0,04				14,8	65,6	0,2
64	Uu>10 ⁵ Mh 10 ⁴	-	-	0,03	0,03	0,02				14,7	48,3	0,3
65	neg	-	-	0,05	0,05	0,02				32,0	42,9	0,7
66	neg	-	-	0,04	0,25	0,02				13,8	23,7	0,5
67	Uu<10 ³	-	-	0,05	0,85	0,05		neg		9,6	68,8	0,1
68	neg	-	-	0,11	0,26	0,02				27,0	41,5	0,7
69	neg	-	-	0,07	0,05	0,03				29,0	53,8	0,5
70	neg	-	-	0,03	0,05	0,02				9,7	51,8	0,2
71	neg	-	-	0,04	0,02	0,02				23,5	38,9	0,6
72	neg	-	-	0,02	0,53	0,02		neg		3,1	85,1	<0,1
73	Mh>10 ⁵	-	-	0,02	0,12	0,02				9,6	76,5	0,1
74	Uu 10 ³ Mh 10 ⁴	-	-	0,25	0,05	0,02	neg			20,1	60,5	0,3
75	neg	-	-	0,06	0,10	0,02				16,7	48,9	0,3
76	neg	-	-	0,06	0,06	0,02				16,6	56,2	0,3
77	neg	-	-	0,48	0,02	0,02	neg			6,1	73,1	0,1
78	neg	-	-	0,83	0,31	0,05	38			23,1	62,9	0,4
79	neg	-	-	0,04	0,03	0,02				1,7	68,1	<0,1

80	Uu 10 ⁴	-	-	0,53	0,03	0,02	neg			24,0	53,7	0,4
81	neg	-	-	0,05	0,02	0,03						
82	Uu 10 ³	-	-	0,10	0,02	0,04				17,4	79,5	0,2
83	neg	-	-	0,01	0,08	0,05				20,8	51,0	0,4
84	neg	-	-	0,47	0,21	0,02	neg			23,8	51,6	0,5
85	neg	-	-	0,15	0,12	0,02				29,4	45,8	0,6
86	neg	-	-	0,58	0,76	0,02	38	38				
87	neg	-	-	0,03	0,11	0,05						
88	neg	-	-	0,03	0,22	0,02				25,9	53,5	0,5
89	neg	-	-	0,06	0,52	0,10		38	38	8,8	77,3	0,1
90	neg	-	-	0,03	0,04	0,07				19,8	62,3	0,3
91	neg	-	-	0,04	0,03	0,02				9,7	47,5	0,2
92	neg	-	-	0,05	0,03	0,02				11,3	68,6	0,2
93	neg	-	-	0,16	0,08	0,02				6,1	82,5	<0,1
94	neg	-	-	0,03	0,19	0,05				19,8	59,9	0,3
95	Uu > 10 ⁵ Mh 10 ⁵	-	-	0,03	0,01	0,02				22,1	49,5	0,4
96	neg	-	-	0,06	0,13	0,03						
97	neg	-	-	0,12	0,42	0,02				8,8	60,8	0,1
98	neg	-	-	0,08	0,09	0,05						
99	neg	-	-	0,21	0,24	0,13			38			
100	neg	-	-	0,71	0,16	0,05	38			0,9	68,2	<0,1
101	neg	-	-	0,48	0,14	0,06	neg					
102	Uu < 10 ³	-	-	0,19	0,05	0,09						
103	neg	-	-	0,81	0,06	0,03	38					
104	neg	-	-	0,24	0,40	0,05	38			7,1	54,9	0,1
105	neg	-	-	0,22	0,02	0,05				9,1	61,9	0,1
106	neg	-	-	0,11	0,04	0,04				1,2	73,2	<0,1
107	neg	-	-	1,10	0,03	0,02	38			2,0	76,0	<0,1
108	neg	-	-	0,00	0,16	0,12			38	9,7	66,9	0,1
109	Uu 10 ³	-	-	0,11	0,03	0,08						
110	Uu 10 ³ Mh 10 ³	-	-	0,01	0,15	0,03						
111	neg	-	-	0,62	0,04	0,06	38					
112	Uu < 10 ³ Mh < 10 ³	-	-	0,17	0,01	0,06				32,6	44,8	0,7

ANEXO 3 – Relação dos indivíduos do grupo DST, com as D.O.s obtidas no teste de ELISA, os resultados do Imunoblot e da PCR para *M. penetrans*.

Nº	cultura	PCR p/ <i>M. penetrans</i>		ELISA			Imunoblot		
		urina	raspado	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
01	neg	-	-	0,09	0,07	0,04			
02	neg	-	-	0,12	0,07	0,05			
03	neg	-	-	0,14	0,12	0,04			
04	neg	-	-	0,10	0,09	0,05			
05	neg	-	-	0,19	0,50	0,04		38	
06	neg	-	-	0,18	0,74	0,06		38	
07	neg	-	-	0,11	0,50	0,04		38	
08	neg	-	-	0,21	0,37	0,04			
09	neg	-	-	0,16	0,02	0,04			
10	neg	-	-	0,10	0,31	0,06			
11	neg	-	-	0,27	0,09	0,06	neg		
12	Uu	-	-	0,18	0,16	0,05			
13	Mh	-	-	0,24	0,01	0,04	neg		
14	neg	-	-	0,27	0,21	0,04	38		
15	neg	-	-	1,03	0,04	0,03	38		
16	neg	-	-	0,17	0,14	0,03			
17	neg	-	-	0,56	0,23	0,27	38		38
18	neg	-	-	0,15	0,05	0,04			
19	neg	-	-	0,35	0,05	0,05	38		
20	neg	-	-	0,05	0,08	0,06			
21	neg	-	-	0,10	0,11	0,05			
22	neg	-	-	0,15	0,03	0,04			
23	neg	-	-	0,27	0,06	0,07	neg		
24	neg	-	-	0,10	0,08	0,05			
25	neg	-	-	0,08	0,58	0,03		38	
26	neg	-	-	0,10	0,26	0,99			38
27	neg	-	-	0,13	0,04	0,16			38
28	neg	-	-	0,11	0,09	0,11			38
29	neg	-	-	0,29	0,09	0,14	38		38
30	neg	-	-	0,09	0,06	0,09			
31	neg	-	-	0,09	0,03	0,18			38
32	neg	-	-	0,24	0,07	0,02	38		
33	neg	-	-	0,01	0,08	0,26			38
34	neg	-	-	0,09	0,08	0,02			
35	neg	-	-	0,13	0,21	0,16			38
36	neg	-	-	0,00	0,18	0,19			38
37	neg	-	-	0,01	0,39	0,02			
38	neg	-	-	0,02	0,02	0,03			
39	Uu 10 ³	-	-	0,01	0,02	0,02			
40	Uu 10 ⁵	-	-	0,20	0,03	0,02			
41	neg	-	-	0,00	0,06	0,19			neg

42	neg	-	-	0,00	0,06	0,02			
43	neg	-	-	0,02	0,02	0,02			
44	neg	-	-	0,14	0,10	0,02			
45	neg	-	-	0,08	0,05	0,02			
46	neg	-	-	0,00	0,18	0,02			
47	Mh 10 ⁵ Uu 10 ³	-	-	0,27	0,03	0,02	38		
48	Uu 10 ⁴	-	-	0,01	0,03	0,03			
49	Uu>10 ⁵	-	-	0,08	0,05	0,02			
50	neg	-	-	1,01	0,03	0,08	neg		
51	neg	-	-	0,93	0,18	0,04	neg		
52	neg	-	-	0,08	0,04	0,72			neg
53	Uu 10 ³	-	-	0,02	2,03	0,22		38	neg
54	neg	-	-	0,04	0,07	0,02			
55	neg	-	-	0,01	0,23	0,02			
56	neg	-	-	0,03	0,05	0,03			
57	neg	-	-	0,05	0,04	0,02			
58	neg	-	-	0,04	0,10	0,02			
59	neg	-	-	0,09	0,01	0,02			
60	neg	-	-	0,06	0,07	0,02			
61	neg	-	-	0,04	0,00	0,02			
62	neg	-	-	0,02	0,05	0,02			
63	neg	-	-	0,17	0,11	0,02			
64	neg	-	-	0,03	0,21	0,02			
65	Uu 10 ³	-	-	0,01	0,11	0,06			
66	neg	-	-	0,02	0,06	0,02			
67	Uu 10 ⁵	-	-	0,08	0,45	0,02		neg	
68	neg	-	-	0,10	0,13	0,02			
69	neg	-	-	0,04	0,07	0,02			
70	neg	-	-	0,85	0,08	0,02	neg		
71	Uu 10 ⁴	-	-	0,00	0,07	0,46			neg
72	neg	-	-	0,10	0,43	0,03			
73	neg	-	-	0,04	0,10	0,00			
74	Uu 10 ⁵	-	-	0,03	0,15	0,00			
75	neg	-	-	0,06	0,06	0,01			
76	neg	-	-	0,06	0,06	0,01			
77	Uu 10 ⁴	-	-	0,18	0,30	0,01			
78	neg	-	-	0,10	0,19	0,01			
79	neg	-	-	0,01	1,07	0,01		neg	
80	neg	-	-	0,07	0,09	0,02			
81	neg	-	-	0,58	0,19	0,01	neg		
82	neg	-	-	0,78	0,20	0,03	neg		
83	neg	-	-	0,08	0,04	0,02			
84	neg	-	-	0,35	0,03	0,02	38		
85	Uu<10 ³	-	-	0,02	0,42	0,01		38	
86	neg	-	-	0,03	0,31	0,01			

87	neg	-	-	0,08	0,03	0,01			
88	neg	-	-	0,09	0,07	0,01			
89	neg	-	-	0,02	0,02	0,00			
90	neg	-	-	0,03	0,12	0,02			
91	Uu 10 ⁵	-	-	0,05	0,15	0,02			
92	neg	-	-	0,07	0,17	0,02			
93	neg	-	-	0,08	0,19	0,03			
94	neg	-	-	0,55	0,15	0,15	neg		38
95	neg	-	-	0,03	0,36	0,03			
96	neg	-	-	0,01	0,18	0,34			neg
97	neg	-	-	0,02	0,37	0,05			
98	neg	-	-	0,01	0,00	0,03			
99	neg	-	-	0,08	0,13	0,13			neg
100	neg	-	-	0,08	0,52	0,12		38	neg
101	neg	-	-	1,13	1,16	0,06	neg	neg	
102	neg	-	-	0,01	0,24	0,10			neg
103	neg	-	-	0,05	0,20	0,03			
104	Uu 10 ⁵	-	-	0,03	0,05	0,05			
105	neg	-	-	0,07	0,30	0,03			
106	neg	-	-	0,06	0,27	0,16			neg
107	neg	-	-	0,08	1,39	0,08		neg	
108	neg	-	-	0,03	0,05	0,03			
109	neg	-	-	0,02	0,15	0,05			
110	neg	-	-	0,35	0,12	0,03	38		

ANEXO 4 – Relação das amostras de soro dos indivíduos HIV-negativos utilizadas para a determinação da faixa de corte do teste de ELISA para *M. penetrans*, e os resultados de suas respectivas leituras de D.O.

Nº	ELISA		
	IgG	IgM	IgA
1.	0,10	0,01	0,03
2.	0,10	0,05	0,03
3.	0,08	0,03	0,03
4.	0,08	0,03	0,07
5.	0,03	0,04	0,03
6.	0,09	0,01	0,02
7.	0,12	0,05	0,04
8.	0,12	0,08	0,07
9.	0,09	0,79	0,04
10.	0,08	0,07	0,03
11.	0,06	0,01	0,02
12.	0,07	0,02	0,03
13.	0,09	0,09	0,03
14.	0,05	0,04	0,03
15.	0,08	0,01	0,04
16.	0,12	0,18	0,04
17.	0,07	0,02	0,03
18.	0,12	0,03	0,05
19.	0,15	0,04	0,03
20.	0,11	0,09	0,05
21.	0,08	0,22	0,03
22.	0,04	0,3	0,05
23.	0,07	0,07	0,03
24.	0,06	0,08	0,03
25.	0,12	0,01	0,05
26.	0,14	0,01	0,03
27.	0,12	0,02	0,03
28.	0,08	0,17	0,02
29.	0,08	0,03	0,04
30.	0,06	0,08	0,03
31.	0,18	0,23	0,04
32.	0,13	0,04	0,06
33.	0,14	0,05	0,03
34.	0,12	0,04	0,05
35.	0,11	0,37	0,04
36.	0,11	0,07	0,04
37.	0,10	0,13	0,03
38.	0,14	0,08	0,07
39.	0,16	0,46	0,05
40.	0,07	0,03	0,03

41.	0,12	0,02	0,04
42.	0,12	0,2	0,03
43.	0,09	0,34	0,03
44.	0,12	0,03	0,03
45.	0,11	0,03	0,04
46.	0,16	0,15	0,05
47.	0,14	0,06	0,04
48.	0,09	0,01	0,04
49.	0,12	0,03	0,03
50.	0,07	0,73	0,03
51.	0,11	0,14	0,05
52.	0,17	0,05	0,05
53.	0,22	0,1	0,04
54.	0,13	0,09	0,05
55.	0,13	0,21	0,03
56.	0,24	0,08	0,09
57.	0,16	0,03	0,04
58.	0,11	0,01	0,04
59.	0,08	0,03	0,04
60.	0,15	0,04	0,04
61.	0,15	0,03	0,05
62.	0,14	0,79	0,05
63.	0,08	0,04	0,04
64.	0,08	0,64	0,05
65.	0,16	0,02	0,03
66.	0,04	0,04	0,02
67.	0,06	0,07	0,03
68.	0,06	0,01	0,02
69.	0,10	0,01	0,06
70.	0,18	0,06	0,04
71.	0,08	0,04	0,03
72.	0,22	0,07	0,07
73.	0,11	0,03	0,04
74.	0,07	0,01	0,03
75.	0,06	0,15	0,03
76.	0,08	0,03	0,03
77.	0,11	0,03	0,03
78.	0,13	0,02	0,04
79.	0,12	0,01	0,04
80.	0,22	0,05	0,12
81.	0,44	0,1	0,02
82.	0,19	0,09	0,04
83.	0,13	0,21	0,07
84.	0,12	0,08	0,06
85.	0,13	0,03	0,03
86.	0,17	0,01	0,04

ANEXO 5. Amostras que tiveram resultado positivo, por cultura ou PCR, do grupo de indivíduos infectados pelo HIV.

No.	cultura	PCR Cultura			PCR genérico		PCR Urealyt		PCR Mhom		PCR Genitallium		PCR Fermentans		PCR Penetrans	
		Uu A+B	Uu B	Mhom	Urina	Raspad	Urina	Raspad	Urina	Raspad	Urina	Raspad	Urina	Raspad	Urina	Raspad
24	Uu 10 ³	pos	-		-	-										-
27	Uu 10 ³	pos	pos		-	pos		-		-		-		-		-
40	Uu 10 ³	pos	pos		-	pos		-		-		-		-		-
51	Uu 10 ³	pos	-		-	-										-
52	Uu 10 ³	pos	pos		pos	-			-			-				-
54	Uu 10 ³	pos	-		-	-										-
55	Uu 10 ³	pos	pos		-	-										-
58	Uu>10 ⁵ Mh 10 ⁵	pos	pos	pos	-	-										-
59	Uu 10 ⁵	pos	-		pos	pos		-		-		-		-		-
62	Uu 10 ⁴ Mh 10 ⁵	pos	-	pos	-	pos		-		-		-		-		-
64	Uu>10 ⁵ Mh 10 ⁴	pos	pos	pos	-	pos		-		-		-		-		-
67	Uu<10 ³	pos	pos		-	pos		-		-		-		-		-
73	Mh>10 ⁵			pos	-	pos		-		-		-		-		-
74	Uu 10 ³ Mh 10 ⁴	pos	-	pos	-	pos		-		-		-		-		-
80	Uu 10 ⁴	pos	-		-	pos		-		-		-		nr		-
82	Uu 10 ³	pos	pos		pos	pos		-		-		-		-		-
95	Uu>10 ⁵ Mh 10 ⁵	pos	-	pos	pos	pos		-		-		-		-		-
102	Uu<10 ³	pos	pos		-	pos		-		-		-		-		-
109	Uu 10 ³	pos	-		-	pos		-		-		-		-		-
110	Uu 10 ³ Mh 10 ³	pos	-	pos	-	pos		-		-		-				-
112	Uu<10 ³ Mh<10 ³	pos	pos	pos	-	-										-
01	-				-	pos		-		-				nr		pos
02	-				-	pos		-		-				nr		pos

[illegible]

85	-					-	pos			-		-		-	-
87	-					-	pos			-		pos		-	-
88	-					-	pos			-		pos		-	-
89	--					pos	pos			-		pos		-	-
92	-					-	pos			-		-		-	-
97	-					pos	pos			-		-		-	-
22	-					-	-			-		-		pos	-

ANEXO 6. Amostras que tiveram algum resultado positivo, por cultura ou PCR, dos indivíduos do grupo DST.

No.	cultura	PCR Cultura			PCR genérico		PCR U. urealyt		PCR M.hom		PCR Genitium		PCR Fermentans		PCR Penetrans	
		Uu A+B	Uu B	M.hom	Urina	Raspad	Urina	Raspad	Urina	Raspad	Urina	Raspad	Urina	Raspad	Urina	Raspad
24	Uu<10 ³	pos	pos		-	-										-
39	Uu>10 ⁶	pos	pos		-	pos							-			-
40	Uu 10 ⁵	pos	-		-	-										-
47	Uu 10 ³ Mh 10 ⁵	pos	-	pos	-	pos						-	pos			-
48	Uu 10 ⁴	pos	pos		-	-										-
49	Uu 10 ⁵	pos	pos		-	-										-
53	Uu 10 ³	pos	-		-	-										-
65	Uu 10 ³	pos	-		-	-										-
67	Uu 10 ⁵	pos	-		-	-										-
71	Uu 10 ⁴	pos	pos		-	-										-
74	Uu 10 ⁵	pos	-		-	-										-
77	Uu 10 ⁴	pos	pos		-	-										-
85	Uu 10 ⁴	pos	pos		-	-										-
91	Uu 10 ⁵	pos	pos		-	pos										-
104	Uu 10 ⁵	pos	-		-	pos										-
87	-				-	pos		pos		-		-	-			-
83	-				-	pos		-		-		-	nr			-
84	-				-	pos		-		-		-	nr			-
92	-				-	pos		-		-		pos				-
93	-				-	pos		-		-		pos				-
94	-				-	pos		-		-		-	-			-
96	-				-	pos		-		-		pos				-
97	-				-	pos		-		-		pos				-
98	-				-	pos		-		-		-	-			-
100	-				-	pos		-		-		pos				-
101	-				-	pos		-		-		pos				-
102	-				-	pos		-		-		-	-			-
103	-				-	pos		-		-		-	-			-
105	-				-	pos		-		-		pos				-

106	-					-	pos			-		-
107	-					-	pos			-		-
108	-					-	pos			-		-
109	-					-	pos			-		-
110	-					-	pos			-		-