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

MICOPLASMAS: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO
EM MATERIAL CERVICAL DE GESTANTES

REGINA AYR FLÓRIO DA CUNHA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof.^a Dr.^a. SUEKO TAKIMOTO MASAOKA

São Paulo
1987

Dedico este trabalho
a vocês,

Celso e Otilia, meus pais
pelo amor que me dedicaram,
peço exemplo, a dedicação e
sobretudo pela **presença** em todos
os momentos de minha vida
e que foram a base para minhas conquistas...

À Raquelzinha,

minha grande pequenina,

À você Mariangela,

querida mana, pelo apoio,
pelo carinho e pela amizade de sempre.

AGRADECIMENTOS

É quase impossível agradecer a todos que cola boraram na elaboração deste trabalho, no entanto, deixamos aqui os mais sinceros agradecimentos:

- Prof^a Dra. SUEKO TAKIMOTO MASAOKA, pela orientação segu ra, apoio e amizade a mim dedicados.
- Prof^a Dra. KIOKO TAKEI, pela amizade, carinho, incentivo e sobretudo pela valiosa e direta colaboração no desenvol^u vimento do presente trabalho.
- Prof^a Dra. SUMIE HOSHINO SHIMIZU, pela colaboração pres tada na revisão do texto e pelos conselhos oportunos, que tanto contribuíram para meu desenvolvimento científico.
- Prof. Dr. JOAQUIM ANTONIO ROSSINI, pela oportunidade na iniciação ao estudo dos micoplasmas.
- ã ELSA MASAE MAMIZUKA, pela amizade, carinho e estímulo ao ingresso na carreira científica.
- Prof. Dr. PAULO SUYOSHI MINAMI, Coordenador do Curso de Pós-Graduação, pelo apoio durante a realização deste tra^u balho.
- Prof. Dr. BRUNO STRUFALDI, Chefe do Departamento, pelo es^u tímulo e apoio às atividades de pesquisa.
- ã MARIA DE FÁTIMA BORGES PAVAN, pelas suas oportunas ob^u servações na revisão linguística do texto.

- à Equipe Médica do Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sob a chefia do Dr. MARCELO ZUGAIB, e em especial:
- à Dra. MARILENA CURY e Dr. MUCIO DINIZ PONTES, pela acolhida, pelo entusiasmo demonstrado na realização deste trabalho e por nos ter permitido colher amostras de suas pacientes.
- Dr. ROSALVO GUIDOLIN, Coordenador do Setor de Fracionamento do Instituto Butantã, cuja ajuda valiosa contribuiu para conclusão da parte experimental.
- à ANA MARIA FERNANDES, colega e amiga de tantos anos, Chefe do Setor de Fermentações da "SQUIBB", por todo carinho e amizade demonstrados e pelos reagentes cedidos.
- Prof. Dr. NEY SOARES DE ARAUJO, Vice-diretor da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, que permitiu a realização dos trabalhos fotográficos na sua unidade e em particular ao Dr. JOSÉ CAMPOS, fotógrafo, pelos serviços e pela atenção a mim dispensados.
- à MARIA IZUMI OTTA, pela amizade demonstrada e pela colaboração na parte experimental.
- à MOENA RODRIGUES DOS SANTOS, bibliotecária, pela boa vontade e eficiência na correção das referências bibliográficas.
- à SILVANIA M.P. NEVES, Chefe do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela atenção que sempre nos dispensou.
- às colegas YOSHIMI I. YAMAMOTO e KÁTIA S.C. PRIMAVERA, pelo carinho e estímulo.
- à IDALINA AFONSO, pela precisão nos serviços datilográficos e pelo carinho e amizade a mim dispensados.

- à SILVIA PASCHOAL, MARLENE B. DE ASSIS, à ZU E MARRÕ, pela amizade e pelo apoio em todas as horas.
- e ainda à MARIA INES CARDILLO, CHENY CHANG, LUIZ CLAUDIO SILVA, SONIA CARAMICO, NEUZA DA SILVA, VALENTINA PIGOZZI, RONALDO MILHIM e à todos deste Departamento que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trbalho.

ÍNDICE

	Pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 - <u>Material Cervical</u>	30
2.2 - <u>Meios de Cultura</u>	35
2.2.1 - Meio líquido de transporte - MLTr	35
2.2.2 - Meio líquido utilizado para cultivo de <i>Ureaplasma urealyticum</i> - MLU	36
2.2.3 - Meio líquido para cultivo de <i>Mycoplasmas</i> no trato geniturinário, que hidrolizam a arginina, tais como: <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Mycoplasma fermentans</i> : MLA	38
2.2.4 - Meio líquido empregado na determinação da fermentação da glicose: MLG	39
2.2.5 - Meio sólido utilizado no isolamento de <i>Ureaplasma urealyticum</i> e de outros micoplasmas genitais: MSM	40
2.2.6 - Meio sólido utilizado para a redução do tetrazólio: MSTz	41
2.2.7 - Meio sólido utilizado para a determinação da atividade da fosfatase: MSAF	43
2.2.8 - Meio sólido utilizado para a detecção da formação de filmes e "spots": MSFFS	44
2.3 - <u>Teste de sensibilidade à digitonina</u>	45
2.4 - <u>Obtenção do anti-soro</u>	49
2.4.1 - Imunização dos coelhos	50
2.4.2 - Titulação dos soros imunes obtidos	51
2.4.3 - Técnica de inibição metabólica	52

2.5 - <u>Identificação Sorológica dos Micoplasmas</u>	
<u>Isolados das Amostras Clínicas</u>	53
2.5.1 - Preparo do antígeno padrão na forma solúvel	54
2.5.2 - Preparo dos antígenos solúveis, a partir dos micoplasmas isolados das amostras clínicas	55
2.5.3 - Imunodifusão dupla de OUTCHTERLONY	56
2.6 - <u>Teste Estatístico</u>	58
3 - RESULTADOS	59
3.1 - <u>Padronização Técnica</u>	59
3.2 - <u>Identificação das espécies <i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Mycoplasma hominis</i> nas amostras clínicas</u>	61
3.3 - <u>Isolamento do <i>Ureaplasma urealyticum</i> e do <i>Mycoplasma hominis</i> em amostras clínicas</u>	65
3.4 - <u>Análise Estatística</u>	69
3.5 - <u>Resultado das gestações das pacientes estudadas</u>	70
3.6 - <u>Relação entre a presença de <i>Trichomonas</i> sp e micoplasmas</u>	77
4 - DISCUSSÃO	79
5 - RESUMO E CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1 - INTRODUÇÃO

HISTÓRICO

O estudo dos micoplasmas teve início em 1882 com Louis Pasteur, o primeiro a reconhecer que a pleuropneumonia bovina, doença respiratória grave, era causada por um agente infeccioso específico, o qual não podia ser observado através da microscopia comum e também pouco crescia nos meios nutricionais empregados usualmente em bacteriologia^{33,59,108}.

Essa doença, que chegou a atingir rebanhos inteiros, assumiu grande importância econômica pela alta letalidade. Surgiu, de acordo com FOSTER³⁸, na Suíça e Alemanha por volta de 1713, e na Inglaterra em 1735. Em fins do século XVIII acabou disseminando-se por toda a França e Itália.

Da Inglaterra estendeu-se para a Austrália em 1858, através da importação de gado, e na mesma época, da Holanda para a África do Sul, tendo posteriormente se disseminado para várias partes do mundo com exceção do oeste da Europa, Índia e América do Norte.

Nos Estados Unidos a doença surgiu em 1843, tendo sido rapidamente erradicada, devido à implantação de medidas governamentais enérgicas^{59,108,125}.

Na China, o primeiro surto aconteceu em 1919 em Shanghai, devido a um suprimento de leite de vaca contaminado vindo da Austrália; em 1920, na cidade de Hong Kong, foi também evidenciada a presença da doença em rebanhos; procedendo a contaminação da mesma fonte. Em 1932, o Registro de Saúde Municipal de Shanghai registrava que, naquele ano, 10,4% do gado havia morrido em decorrência da doença^{59,108,125}.

Dada a sua importância, vários pesquisadores voltaram suas atenções para a patologia e em 1898 NOCARD e ROUX obtiveram sucesso quanto ao crescimento do agente em meios artificiais, constituindo-se no primeiro grande passo ao estudo do então denominado "Microbe de la Péripleumoniae"⁹².

Em 1910, BORDET seguido por BORREL, DUJARDIN-BEAUMETZ, JEANTET e JOUAN^{8,9} descreveram minuciosamente o microrganismo em seus vários estágios evolutivos, através do exame à fresco e com o auxílio do ultramicroscópio, evidenciando seu intenso polimorfismo.

Suas dimensões diminutas permitiam sua filtração através de filtros especiais que retinham bactérias e portanto sua capacidade de atravessar membranas filtráveis os colocava entre os "vírus filtráveis", não no sentido estrito, uma vez que já haviam conseguido sua multiplicação em meios artificiais^{31,33,59,92,103}.

Em 1923, BRIDÉ e DONATIEN¹² cultivaram pela primeira vez, em meio livre de células, o agente infeccioso causador da agalaxia, doença esta que atingia sobretudo rebanhos de carneiros e cabras. Da mesma forma que o agente etiológico da pleuropneumonia bovina, este mostrou-se "filtrável", e possuidor de características morfológicas, culturais e biológicas muito semelhantes, diferindo contudo do mesmo quanto à patogenicidade e às reações imunológicas^{12,94}.

Enquanto a pleuropneumonia bovina, doença altamente contagiosa, caracterizava-se principalmente pela extensa consolidação, pleurisia e derrame subpleural afetando normalmente um ou ambos os pulmões, a agalaxia era uma doença sistêmica que afetava machos e fêmeas igualmente, com particular envolvimento das juntas, dos olhos e dos processos da lactação, podendo no caso de animais prenhes levar ao aborto de fetos mortos ou malformados^{31,67,108}. A agalaxia predominou na Europa, sobretudo nas regiões montanhosas da Itália, França e Suíça, ocorrendo também na Argélia.

Apesar de ter surgido uma série de publicações referindo-se à morfologia e propriedades bioquímicas desses dois microrganismos^{67,78,94,130,134}, somente em 1934, SCHOETENSACK fez o terceiro relato, sobre o cultivo em meios artificiais, de um novo microrganismo com características semelhantes, desta vez isolado de cães com distúrbios respiratórios típicos da cinomose¹¹⁸.

Nos anos que se seguiram, microrganismos semelhantes ao agente da pleuropneumonia bovina foram isolados de outros animais sendo por essa razão denominados de PPLO³³.

Em 1935, KLIENE⁶⁹BERGER, estudando culturas do *Streptobacillus moniliformes*, habitante natural da nasofaringe de ratos, julgou ter isolado um novo "pleuro-pneumonia-like organisms", denominando-o L₁. Inicialmente considerou-o um simbiote do *Streptobacillus moniliformes*, no que foi apoiado por DIENES²⁵. Todavia, a continuidade dos estudos sobre L₁, veio esclarecer que o mesmo não era um PPLO e sim uma variante do bacilo, uma forma L.^{24,26,68}.

Na sequência de isolamentos e cultivos de novos elementos do grupo PPLO, uma contribuição muito importante foi dada em 1936, quando LAIDLAW e ELFORD⁷⁶ puderam caracterizar um grupo novo de microrganismos "filtráveis", isolados da água de esgotos de distritos londrinos. Esses assemelhavam-se muito aos membros do grupo PPLO, mas diferiam daquelas isolados anteriormente pela capacidade de crescer em meios de cultura sem soro, e por não serem patogênicos para os animais, sendo considerados cepas saprófitas dentro do grupo^{33,108}.

Posteriormente seguiram-se outros isolamentos de microrganismos do grupo PPLO; de animais, do solo, de material orgânico em decomposição, etc., até que em 1937, DIENES e EDSALL registraram o primeiro caso humano²⁵. Esta cepa foi obtida em cultura pura, a partir da glândula de Bartolin supurada, de um paciente que trabalhava no laboratório e cujo contacto frequente com ratos servia como possível explicação para o achado. Esta cepa perdeu sua viabilidade antes de ser identificada biológica e sorologicamente. Contudo, em 1940, o próprio DIENES relatava o cultivo de PPLO do trato

genital feminino²³, sugerindo que, de acordo com os novos conhecimentos, os isolamentos anteriores não possuíam qualquer relação com o contacto com ratos ou outros animais. Quanto à patogenicidade nada ficou constatado, muito embora algumas evidências do primeiro isolamento assim a sugerissem.

A partir da descoberta de DIENES e EDSALL, houve um grande número de registros sobre o frequente isolamento de PPLO no homem, especialmente do trato urogenital, orofaringe e ocasionalmente de outras partes do corpo. A maioria contudo não foi caracterizada antígenicamente ou preservada para uma futura análise, o que impossibilitava fazer uma correlação entre as várias cepas.

Em fins da década de 30 e início de 1940 ficou evidenciado que um grande número de pneumonias não eram de origem bacteriana, sendo denominadas de "Pneumonias Atípicas Primárias" (PAP)⁵⁹.

Pelo fato dos agentes dessas pneumonias não serem conhecidos, as PAPs foram clinicamente descritas como uma síndrome. Em 1943, notou-se que muitos pacientes acometidos com a PAP, apresentavam crioaglutininas no soro, durante o curso da doença, cuja etiologia era distinta das demais.

Em 1944, EATON evidenciou o agente através da inoculação em ovos embrionados de galinha, do filtrado de escarro de pacientes com pneumonia⁵⁹. O microrganismo previamente denominado "agente de Eaton" foi considerado um

vírus, até que em 1962, CHANOCK et al. conseguiram seu cultivo em meios artificiais caracterizando-o como um PPLO, agente etiológico da doença humana¹⁷. Em 1963, *Mycoplasma pneumoniae* foi o nome proposto pelo próprio CHANOCK e cols., para denominar o agente da PAP¹⁶.

Posteriormente, vários outros membros do grupo PPLO foram descobertos e caracterizados, principalmente os associados com o trato urogenital tanto masculino como feminino, e a partir daí os esforços foram concentrados com a finalidade de definir sua real importância nas diferentes patologias humanas.

TAXONOMIA

A nomenclatura dos microrganismos do chamado "grupo da pleuropneumonia" foi sempre bastante confusa. A validade das publicações e a legitimidade dos vários nomes atribuídos aos membros desse grupo foram sempre questionadas.

O primeiro microrganismo descrito desse grupo, o agente da pleuropneumonia bovina, recebeu várias denominações. A primeira foi: *Asterococcus mycoides*, nome este atribuído por BORREL e col. em 1910, após seus estudos sobre a morfologia do microrganismo. Esses autores observaram que dentre as várias formas sob a qual "le microbe" se apresen

tava, as formações asteroidais eram características. A denominação genérica, *Asterococcus*, foi entretanto invalidada, por ter sido atribuída anteriormente, 1908, a um gênero de algas¹¹⁰ sendo aceito apenas o termo *mycoides*.

Coccobacillus mycoides pēripneumoniae foi a segunda denominação do microrganismo, dada por MARTZINOVSKI, em 1911⁸⁵, que ao publicar os resultados de suas pesquisas sobre a morfologia do agente evidenciou a predominância de formas cocobacilares sobre as asteroidais descritas anteriormente. O termo genérico *Coccobacillus* já havia sido atribuído em 1888 a um outro microrganismo de características diferentes, e este, portanto, também foi ilegitimado⁵⁹.

Em 1923, FROSCH (citado em ⁹³) propôs o termo *Micromyces pēripneumoniae bovis contagiosae*, que foi também invalidado porque o termo genérico *Micromyces* já tinha sido empregado para denominar um grupo de fungos.

NOWAK, em 1929, fez uma revisão na literatura, quanto aos nomes que haviam sido usados. Não discutiu a nomenclatura, mas descrevendo o microrganismo em estudo, propôs um novo termo enfatizando: "Le terme *Mycoplasma pēripneumoniae* semble rēpondre le mieux à la nature et à la morphologie du microbe"⁹³. O epíteto *pēripneumoniae* foi invalidado, sendo substituído por *mycoides*, o qual tinha prioridade sobre os demais.

O termo genérico *Mycoplasma* (myces=fungo; plasma=formado ou moldado, uma forma, *forma de fungo), foi aceito publicamente embora as publicações subsequentes não o tini

vessem adotado.

Em 1931, WROBLEWSKI¹³⁴, estudando as razões pelas quais os autores anteriores haviam atribuído as denominações, não concordou com as já existentes e introduziu o termo *Asteromyces pēripneumoniae bovis*. O nome da espécie foi invalidado, porque o epíteto *pēripneumoniae bovis* foi empregado no lugar do termo *mycoídes*, o qual era prioritário.

O agente etiológico da agalaxia recebeu a denominação *Anulomyces agalaxie* do próprio WROBLEWSKI no mesmo ano¹³⁴. O termo genérico *Anulomyces* foi por ele proposto por ter observado o que ele chamou de "anneaux du mycelium" (anéis miceliais). O epíteto específico *agalaxiae* foi substituído por *agalactiae*. A denominação foi aceita e assim os microrganismos causadores da pleuropneumonia bovina e da agalaxia foram colocados em gêneros diferentes.

TURNER¹³⁰, em 1935, discutindo a posição sistemática do microrganismo e sua nomenclatura, descartou todos os nomes genéricos atribuídos anteriormente, inclusive o termo *Anulomyces*, propondo o termo genérico *Borrelomyces* para "perpetuate the name of Borrel" (o primeiro a descrever morfológicamente o microrganismo).

Denominou as duas espécies de: *Borrelomyces pēripneumoniae* para o agente da pleuropneumonia bovina e *Borrelomyces agalactiae* para o agente etiológico da agalaxia.

O epíteto *pēripneumoniae* foi descartado por ra

zões já citadas anteriormente e o termo *Borrelomyces* foi ilegitimado por ser o último sinônimo dentre outros nomes genéricos, considerando-se que o termo *Mycoplasma* já possuía prioridade sobre os demais.

Em 1941, SABIN¹⁰⁸ propôs uma taxonomia e nomenclatura para os microrganismos do grupo PPLO, ignorando nomes e classificações previamente usadas. Todavia, foram também invalidadas devido a ordem de prioridade de termos anteriormente atribuídos.

Em 1955, FREUNDT⁴² estabeleceu a primeira classificação dos microrganismos do grupo PPLO, baseado em suas propriedades gerais que foram assim sumarizadas:

- Crescimento em meios livres de células. Necessidades nutricionais idênticas para a maioria das espécies.
- Peculiar modo de reprodução caracterizado pela ramificação de filamentos e divisão dos mesmos em corpos cocôides elementares.
- Pleomorfismo marcante.
- No meio sólido, aparência característica de colônias diminutas.
- "Filtrabilidade" das menores unidades reprodutivas.
- Pouca afinidade aos corantes bacterianos.
- Alta resistência à penicilina e ao sulfatiazol.

Com base nessas características, com exceção da cepa saprófita *M. laidlawii*, cujas necessidades nutricionais eram diferentes dos demais, a classificação proposta por FREUND foi:

Ordem: *Mycoplasmatales*

Gênero: *Mycoplasma*, Nowak 1929

Espécie 1. *M. mycoides* (Borreli et al 1910)

Sub-espécie 1. *M. mycoides* var. *mycoides*

Sub-espécie 2. *M. mycoides* var. *capri*

Espécie 2. *M. bovigenitalium*

Espécie 3. *M. agalactiae* (Wroblewski, 1931)

Um total de 14 espécies foram portanto determi
nadas.

No mesmo ano, EDWARD³² sugeriu a seguinte nomen
clatura e classificações básicas para os microrganismos do
grupo PPLO:

Ordem: *Mollicutales* (Edward, 1954)

Família: *Mycoplasmataceae* fam. nov.

Gênero: *Mycoplasma*, Nowak 1929

Espécie-tipo: *Mycoplasma mycoides*

O termo *Mollicutales*, introduzido por EDWARD³⁵,
baseava-se na plasticidade dos microrganismos, e o termo
Mycoplasmatales, atribuídos por FREUNDT, derivava do nome
da família, e apesar de seguir as regras de nomenclatura,
era o menos indicado pois sugeria uma relação com fungos.

As duas denominações foram estudadas e o termo
Mycoplasmatales foi considerado como taxonomicamente corre
to.

Em 1967, EDWARD e FREUNDT³⁶ propuseram o termo
Mollicutes (mollis=flexível, mole e cutis=pele), a fim de
denominar uma nova classe dentro da ordem *Mycoplasmatales*.

Este termo foi aceito pelo Subcomitê de Taxonomia dos Mycoplasmatales¹²³, pois fazia referência à ausência de parede celular e à plasticidade da membrana desses microrganismos, características fundamentais do grupo PPLO.

Reforçando a criação de uma nova classe, o estudo do comportamento bioquímico desses microrganismos revelou que a maioria necessitava de esteróis para o crescimento. Estas características aproximavam os micoplasmas dos protozoários, sendo destes distinguidos pela estrutura celular procariótica.

Em 1970, EDWARD e FREUNDT estabeleceram um novo gênero, *Acholeplasma*, e foi criada uma nova família⁴⁸, *Acholeplasmataceae*, dentro da ordem *Mycoplasmatales*.

Faziam parte do novo gênero os microrganismos do grupo PPLO que não necessitavam de esteróis para o crescimento. O termo *Acholeplasma* (A = não; chole = demonstra relação com a bile; plasma = forma) indica portanto que o colesterol, um dos constituintes da bile, não é requerido para o crescimento. A espécie *A. laidlawii* ficou sendo a espécie-tipo do gênero³⁴.

Em 1972, o Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana (ICSB), juntamente com o Subcomitê de Taxonomia dos *Mycoplasmatales*, estabeleceram como padrões mínimos à inclusão de novas espécies na ordem *Mycoplasmatales*: falta de parede celular, aparência colonial típica, filtrabilidade através de membranas filtrantes de 450 nm de diâmetro de poro, e ausência de reversão à forma bacteriana sob condi

ções apropriadas. A classificação em Família, dependeria da determinação das exigências de esteróis para o desenvolvimento, ficando a identificação das diferentes espécies baseada nas características culturais, bioquímicas e antigênicas⁶².

SHEPARD, em 1974, criou o gênero *Ureaplasma* (urea = uréia; plasma = forma), o qual compreendia micoplasma que requeriam uréia para o seu crescimento. *Ureaplasma urealyticum* foi a espécie considerada a espécie-tipo do gênero¹¹⁵.

Em 1973, SAGLIO e seus colaboradores, estudando um grupo de microrganismos que apresentavam forma helicoidal e motilidade rotacional, além de uma série de características pertencentes à classe *Mollicutes*, estabeleceram um novo gênero: *Spiroplasma* (spira = espiral; plasma = forma). *Spiroplasma citri* passou a ser a espécie-tipo do novo gênero¹⁰⁹.

Este gênero foi incluído na família *Spiroplasmataceae* cujo nome foi sugerido por SKRIPAL em 1974, sendo todavia validado somente em 1983¹¹⁹.

Em 1979, foram estabelecidos os padrões mínimos para a descrição de novas espécies da classe *Mollicutes*⁶¹.

Foram ainda reconhecidos como pertencentes a essa classe, os gêneros *Anaeroplasma*¹⁰⁵ e *Thermoplasma*²².

O gênero *Anaeroplasma*, criado por Robinson e cols. em 1975, é constituído por micoplasmas anaeróbios, tendo como espécie-tipo *Anaeroplasma abactoclasticum*¹⁰⁵. O gênero

ro *Thermoplasma*, cuja espécie-tipo é *Thermoplasma acidophilum*²², foi criado por DARLAND em 1970, e compreende microrganismos que se desenvolvem bem a altas temperaturas. Esses dois gêneros, devido a algumas de suas características incomuns, não estão bem definidos taxonomicamente.

O termo "micoplasma" é comumente usado para denotar qualquer espécie incluída na classe *Mollicutes*, contudo as denominações: *acholeplasma*, *ureaplasma*, *espiroplasma* e *anaeroplasma*, são utilizados quando a referência é feita especificamente aos membros dos gêneros correspondentes¹⁰⁰.

De acordo com o **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** de 1984,¹⁰² a posição taxonômica atual dos micoplasmas é a seguinte:

DIVISÃO: *Tenericutes* div. nov.

CLASSE I: *Mollicutes* (EDWARD & FREUNDT, 1967)³⁶

ORDEM I: *Mycoplasmatales* (FREUNDT, 1955)⁴²

FAMÍLIA I: *Mycoplasmataceae* (FREUNDT, 1955)⁴²

Gênero I. *Mycoplasma* (NOWAK, 1929)⁹³

Espécie-Tipo. *Mycoplasma mycoides* (BORREL; DUJARDIN-BEAUMETZ;
JEANTET; JOUAN, 1910)⁹

Gênero II. *Ureaplasma* (SHEPARD; LUNCEFORD; FORD; PURCELL;
TAYLOR-ROBINSON; RAZIN; BLACK, 1974)¹¹⁵

Espécie-Tipo. *Ureaplasma urealyticum* (SHEPARD, 1974)¹¹⁵

FAMÍLIA II. *Acholeplasmataceae* (EDWARD & FREUNDT, 1970)⁴⁸

Gênero I. *Acholeplasma* (EDWARD & FREUNDT, 1970)⁴⁸

Espécie-Tipo. *Acholeplasma laidlawii* (EDWARD & FREUNDT, 1970)³⁴

FAMÍLIA III: *Spiroplasmataceae* (SKRIPAL, 1983)¹¹⁹

Gênero I. *Spiroplasma* (SAGLIO et al., 1973)¹⁰⁹

Espécie-Tipo. *Spiroplasma citri* (SAGLIO et al., 1973)¹⁰⁹

Gêneros de Posição Taxonômica Incerta:

Gênero: *Anaeroplasma* (ROBINSON; ALLISON; HARTMAN, 1975)¹⁰⁵

Espécie-Tipo. *A. abactoclasticum* (ROBINSON et al.,)¹⁰⁵

Gênero: *Thermoplasma* (DARLAND; BRACK; SAMSONOFF; CONTI,
1970)²²

Espécie-Tipo. *Thermoplasma acidophilum* (22)

CARACTERÍSTICAS GERAIS

Morfofisiologia

Desde os estudos realizados no início do século por BORDET e BCRREL sobre a morfologia dos micoplasmas, seu intenso polimorfismo ficou caracterizado. A forma cocôide é a forma predominante em todas as culturas, podendo também ser observadas, na maioria delas, células alongadas,

fusiformes e filamentosas. Essas podem algumas vezes se ramificar dando origem a verdadeiras estruturas miceliais. Os membros das famílias *Mycoplasmataceae* e *Acholeplasmataceae* são portanto descritos como pleomórficos, com a forma celular variando de cocóide à filamentosa^{8,9}.

Em se tratando dos membros da família *Spiroplasmataceae*, a morfologia helicoidal, entre outras características, é um dos principais critérios que os diferencia dos demais.

Quanto ao tamanho desses microrganismos, podem ser considerados os menores procariotos que se auto-replicam, sendo de 300 nm o diâmetro da menor forma cocóide capaz de reprodução. Esta dá-se quase que essencialmente por fissão binária onde a divisão citoplasmática deve ser sincronizada com a replicação do genoma. Quando isto não acontece, a divisão do citoplasma pode estar retardada em relação à do genoma, originando a formação de filamentos multinucleares. Estas formas filamentosas podem atingir 100µm de comprimento por 0,4µm de espessura enquanto que no caso dos espiroplasmas, as formas helicoidais apresentam de 03 a 12µm de comprimento por 0,1 a 0,2 µm de espessura^{47,100}.

A ausência total de parede celular e de seus precursores é a característica mais importante que os distingue de outros procariotos, sendo responsável pela maioria das propriedades desse grupo incluindo sua morfologia típica e plasticidade, sua sensibilidade à lise por choque osmótico, álcoois, solvente orgânicos, detergentes, anticorpo e complemento; sua "filtrabilidade" através de filtros com poros de 0,45µm de diâmetro; sua morfologia colonial ca

racterística de "ovo frito" e sua total resistência à penicilina e outras substâncias antibacterianas que degradam ou inibem especificamente a síntese de peptidoglicana. Portanto a falta de parede celular constitui a base para a inclusão dos micoplasmas na classe *Mollicutes*¹⁰¹.

A célula dos micoplasmas possui um mínimo de organelas essenciais para seu crescimento e reprodução. Uma membrana citoplasmática de natureza lipoprotéica separa o citoplasma do meio em que se encontra; ribossomos congregam as proteínas celulares e uma dupla fita de DNA fornece informações para a síntese protéica^{100,102}.

A relação guanina-citosina (G+C), contida no DNA, é extremamente baixa (23 a 30 mol%), na maioria das espécies¹⁰⁰. A determinação do conteúdo G+C do DNA, tornou-se quase que obrigatória na descrição das várias espécies de micoplasmas⁴⁷.

O tamanho do genoma dos microrganismos pertencentes aos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, é o menor registrado entre os procariotos, refletindo sua limitada capacidade biossintética^{47,100}.

Frequentemente são imóveis, contudo algumas espécies apresentam motilidade por deslizamento sobre superfícies lisas, devido provavelmente a organelas especiais constituídas por proteínas contráteis. Outras espécies, como as do gênero *Spiroplasma* que ocorrem como filamentos helicoidais, possuem motilidade rotacional, flexional e translacional^{47,102}.

Morfologia colonial

De um modo geral, os micoplasmas crescem em meio sólido originando pequenas colônias (menores que 1mm de diâmetro), com aparência típica de "ovo frito", caracterizadas por uma nódula central, devido ao crescimento no interior do meio, circundado por uma zona periférica de crescimento superficial.

Apesar da morfologia colonial não ter papel significativo na classificação das espécies, estas algumas vezes podem exibir relevantes diferenças na forma e tamanho da colônia, dependendo principalmente do meio de cultura. Um exemplo que pode ser dado é o do *Ureaplasma urealyticum* ou T-micoplasma (T = tiny = pequeno, diminuto), que apresenta colônias atípicas e diminutas com diâmetro variando de 5 a 15µm quando do seu cultivo em meios convencionalmente utilizados para o crescimento de outros micoplasmas. Todavia, empregando-se meios nutritivos específicos para o seu crescimento, as colônias apresentam-se maiores (com diâmetro variando de 30 a 40µm) e na forma típica dos demais micoplasmas¹¹⁵.

Necessidades nutricionais e metabolismo

Os meios de cultura empregados no cultivo e isolamento dos micoplasmas são bastantes complexos, tendo como base o infuso de coração, peptonas, extrato de levedura e soro¹⁰⁰.

O soro fornece, entre outros elementos, o colesterol e certos esteróis, parecendo estar relacionados com a fluidez da membrana, e cuja dependência nutricional é característica da grande maioria dos micoplasmas, tendo como exceção os membros da família *Acholeplasmataceae* e certas espécies do gênero *Thermoplasma*, que não os necessitam para o seu crescimento^{30,47}.

O infuso de coração compõe-se sobretudo de aminoácidos e peptonas; além de dextrose e vários íons, utilizados no crescimento e metabolismo dos micoplasmas.

O emprego do extrato de levedura como fonte de fatores essenciais exógenos, embora ainda não bem definido, parece estar relacionado com seu alto conteúdo em âcidos nucléicos e seus precursores, e com seu elevado teor em magnésio⁵⁵.

Para algumas cepas porém, o extrato de levedura produz um efeito inibitório^{43,111}.

A utilização da uréia como fator essencial de crescimento para microrganismos do gênero *Ureaplasma*, é uma característica única entre os *Mollicutes*. A hidrólise intracelular da uréia, pelos ureaplasmas, resulta em amônia e dióxido de carbono, os quais originam um gradiente iônico eletroquímico produzindo ATP^{47,100,115}.

A fermentação da glicose ou outro carboidrato, pode servir como fonte de energia para os micoplasmas que utilizam a via de EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS para a degradação do carboidrato com produção de ATP.

Estas e outras vias para obtenção de energia são utilizadas porque todos os micoplasmas até agora estudados, com exceção do *Thermoplasma acidophilum*, micoplasma de vida livre, possuem um truncado sistema respiratório mediado por flavinas, o qual exclui a fosforização oxidativa como um mecanismo gerador de ATP.

No caso de micoplasmas que não se utilizam de carboidratos energeticamente, o ATP necessário pode ser obtido através da degradação da arginina pela via arginina-dehidrolase³, ou ainda a partir da acetil coenzina A por meio de reações catalizadas pela fosfato acetil transferase e pela acetato quinase^{3,132}.

Embora a grande maioria das espécies de *Mycoplasma* seja metabolicamente glicose-positiva (ex. *M. pneumoniae*) ou arginina-positiva (ex. *M. hominis*), umas poucas espécies são capazes de metabolizar ambas (ex. *M. fermentans*), enquanto que outras espécies não se utilizam de nenhuma das duas vias (*U. urealyticum*)⁴⁷.

A família *Mycoplasmataceae* caracteriza-se pela heterogeneidade no que se refere ao catabolismo glicose/argiنینa, contrastando com a família *Acholeplasmataceae*, onde todas as espécies sõ catabolizam a glicose⁴⁷.

Comportamento Bioquímico

Além dos testes bioquímicos envolvidos no metabolismo dos micoplasmas, considerados como de importância

primária na caracterização taxonômica, um pequeno número de testes adicionais também podem ser úteis.

Entre outros, podemos citar a fermentação de carboidratos, que não a glicose, a atividade da fosfatase, a produção de filmes e "spots" em meio sólido contendo gema de ovo, a redução do tetrazólio em condições aeróbicas e anaeróbicas, e a atividade proteolítica⁶¹.

A maioria destas provas denota propriedades de várias espécies e embora auxilie na identificação das mesmas, é de valor limitado na caracterização definitiva⁴⁷.

Habitat

Os micoplasmas estão amplamente distribuídos na natureza, podendo parasitar o homem, os animais, os artrópodes e as plantas. Apesar de sua ubiquidade, estes microrganismos demonstram um alto grau de especificidade hospedeira.

O habitat primário dos micoplasmas no hospedeiro animal, é a superfície da membrana mucosa dos tratos respiratório, gastrintestinal e geniturinário, sistema nervoso central, canal alimentar, olhos, glândulas mamárias e articulações em alguns animais¹⁰⁰.

Nas plantas, os micoplasmas habitam o floema causando uma grande variedade de doenças, destruindo plantações e causando sérios problemas econômicos.

A transmissão se dá provavelmente através de insetos, nos quais os micoplasmas se multiplicam na hemolinfa e glândulas salivares.

Em todos os processos patológicos de plantas e insetos foram isolados espiroplasmas. Contudo, não somente espiroplasmas, mas também acholeplasmas e micoplasmas têm sido encontrados como comensais de flores e superfícies de plantas.

Embora algumas espécies façam parte da microflora, muitas espécies são patogênicas causando uma variedade de doenças¹⁰⁰.

PATOGENICIDADE E MECANISMO DAS DOENÇAS

Apesar dos mecanismos que mantêm o equilíbrio da flora normal nao estarem bem definidos, vários fatores relativos ao hospedeiro como: a idade, o sexo, a predisposição genética, o estado nutricional, bem como fatores extrínsicos como: ambientais, condições de exposição, etc., parecem estar correlacionados, para a manutenção da hígidez orgânica.

Essencialmente todos os micoplasmas são parasitas, muito deles aderindo à membrana da célula hospedeira. Essa aderência parece ser frequentemente o primeiro passo na colonização e patogenicidade^{65,111}.

Espécies altamente virulentas demonstram pro

priedades invasivas, além de um alto grau de especificidade pelos órgãos e tecidos infectados.

As consequências da infecção micoplásmica, nos tecidos do hospedeiro, variam de acordo com o microrganismo e com o sistema orgânico envolvidos. As alterações observadas podem ser decorrentes de distúrbios na função celular especializada, e a mudanças histopatológicas.

Dentre as espécies que causam patologias podem ser salientadas algumas de interesse humano, as quais possuem a capacidade de se ligar às membranas da célula hospedeira, como *M. pneumoniae* e *Ureaplasma urealyticum*¹⁹.

No caso do *M. pneumoniae* a capacidade de aderência se deve sobretudo a organelas que regulam a citoadsorção. Apesar de ser um patógeno do trato respiratório, sua capacidade de aderir às células epiteliais respiratórias não é exclusiva, estendendo-se a eritrócitos, macrófagos, espermatozóides e frequentemente a superfícies inertes.

As consequências do parasitismo sobre a superfície celular do hospedeiro podem ser ilustradas pelo *M. pneumoniae*. Este, ao aderir a alguns tipos de eritrócitos, provoca lise celular devido à liberação de peróxido. No caso da infecção ocorrer na superfície de células epiteliais ciliadas, trocas metabólicas ocorrem, acarretando diminuição na síntese de macromoléculas, com alterações na utilização de carboidratos e na oxigenação. Deste modo, há uma alteração na função celular com perda do movimento ciliar.

Morfologicamente, o dano celular é caracteriza

do por uma modificação nuclear, pela vacuolização citoplasmática e pelo desarranjo das junções intercelulares, tendo como consequência a destruição das células parasitadas¹⁹.

Ureaplasma urealyticum, quando aderido à membrana celular do trato genital, pode comprometer a atividade ciliar do oviduto provavelmente através da produção de amônia a partir da uréia. Sua capacidade de reduzir a motilidade do espermatozóide por aderência, alterando o processo de fertilização, tem sido discutida^{14,41}.

Outros micoplasmas atuam sobre o hospedeiro de maneira diversa; *Mycoplasma neurolyticum*, por exemplo, através de sua neurotoxina, altera de maneira seletiva a permeabilidade capilar das células endoteliais do cérebro, produzindo em ratos a clássica síndrome denominada "doença do giro"¹⁹.

Outro fator importante no mecanismo das doenças micoplásmicas é a permuta de antígenos entre o microrganismo e a membrana da célula hospedeira. Essa transferência seria decorrente da ausência da parede celular que permite um contacto estreito entre as membranas do micoplasma e da célula do hospedeiro. Desta forma, a aquisição de antígenos do hospedeiro, por parte do microrganismo, pode auxiliar o parasita a evitar ou alterar a resposta imunológica do mesmo. Por outro lado, a aquisição de antígenos micoplásmicos pela membrana do hospedeiro pode desencadear reações auto-imunes, muito comuns nas infecções micoplásmicas¹⁰⁰.

Dentre as diversas patologias associadas a in

fecções por micoplasmas, o presente trabalho tem enfoque mais direcionado à infecção humana do trato geniturinário, sendo que das doze espécies da classe *Mollicutes* encontradas no homem, quatro estão associadas com alterações do trato geniturinário: *Mycoplasma hominus*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma fermentans* e *Mycoplasma genitalium*.

Presume-se que a grande maioria das cepas isoladas do trato geniturinário humano, referidas entre 1940 e 1950 como "Pleuro-Pneumoniae-Like-Organisms" (PPLLO), fosse de fato *Mycoplasma hominis*. Isto porque *Mycoplasma fermentans* só é isolado muito raramente e os demais, *Mycoplasma genitalium* e *Ureaplasma urealyticum*, não poderiam ter formado colônias possíveis de serem reconhecidas naqueles meios utilizados e naquelas condições de crescimento⁴⁵.

A relação entre o isolamento desses microrganismos e a sua etiologia nas doenças humanas e mais particularmente nas patologias do trato urogenital, vem sendo objeto de estudos desde 1937²⁵.

A baixa frequência de isolamento do *Mycoplasma fermentans* dificulta o estudo de seu potencial como patógeno. Uma vez que *Mycoplasma genitalium* foi identificado só recentemente com a utilização de meios mais complexos, o presente estudo foi portanto dirigido para as espécies genitais primárias: *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum*.

ENVOLVIMENTO DO *Mycoplasma hominis* E DO *Ureaplasma urealyticum*
NAS ALTERAÇÕES CLÍNICAS DO TRATO GENITURINÁRIO

As altas taxas de colonização desses microrganismos, no homem e na mulher em idade fértil, mesmo sem qualquer sintomatologia de doença, torna difícil estabelecer uma relação entre a sua real patogenicidade e sua presença nas secreções vaginais e uretrais⁷.

Todavia, vários são os trabalhos que atribuem a esses microrganismos a etiologia de uma série de patologias. O *Ureaplasma urealyticum*, em particular, é responsabilizado por 50% das uretrites não gonocócicas^{4,10,13,112,127}.

Constatou-se que a incidência de micoplasmas na mulher é maior do que no homem, considerando-se grupos similares. Na mulher, a colonização vaginal pelo *H. hominis* e pelo *Ureaplasma urealyticum*, é maior naquelas de nível sócio-econômico mais baixo, e com atividade sexual mais intensa. Ambos os agentes são mais frequentemente isolados em mulheres de raça negra do que em mulheres de raça branca^{1,88}.

Por serem os *Mollicutes* comprovadamente responsáveis por uma série de problemas de reprodução em alguns animais e por serem algumas espécies capazes de causar infecção no homem, pressupõe-se que analogamente a colonização humana também possa contribuir para a infertilidade e perda fetal^{122,126}.

O estudo, que inicialmente despertou o interesse

pelos micoplasmas nas chamadas "falhas da reprodução humana", foi apresentado em 1967 por KUNDSIN e DRISCOLL⁷⁴, que verificaram o crescimento da cepa T-micoplasma (ureaplasma), no c6rion, dec6dua e 6mnion de uma paciente que abortara no segundo trimestre de gesta66o. Subsequentemente a este achado, uma s6rie de trabalhos tem se referido ao envolvimento desses microrganismos em v6rias altera666es materno-fetais tais como: febre puerperal e p6s-aborto^{6,58,64,77,120,129} abortos espont6neos, natimortos, nascimento de prematuros, nascimento de malformados e com baixo peso para a idade gestacional^{15,18,27,28,29,37,57,63,72,73,98,106,124}.

O mecanismo que associaria a infec666o ureapl6smica com casos de aborto espont6neo, malforma666o fetal, etc., 6 desconhecido. Constatou-se experimentalmente que al6m do efeito citop6tico sobre as c6lulas, a ureaplasma 6 capaz de induzir aberra6666es cromoss6micas como: falhas e "quebras" cromossomais, tetraploidias, etc. A alta frequ6ncia de perfis cromoss6micos anormais em tecidos fetais abortados e o encontro de ureaplasmas em v6rios desses tecidos, sugere que melhores estudos devam ser cada vez mais intensificados nesse sentido^{49,71}.

GNARPE & FRIBERG, estudando os micoplasmas nas altera6666es da reprodu6666o, constataram a alta preval6ncia dos T-micoplasmas no trato genital de pacientes com infertilidade sem causas definidas. Estes microrganismos foram erradicados ap6s tratamento com doxiciclina, tendo sido observado um aumento consider6vel nas taxas de gesta666o em grupo de casais tratados⁵⁰.

No que se refere ainda ao seu envolvimento em casos de infertilidade inexplicados, os T-micoplasmas podem causar endometrites na mulher, devido à sua fixação às células endometriais, enquanto que no homem, esses microrganismos podem ser encontrados aderidos às células espermáticas, permanecendo ainda obscuro o mecanismo pelo qual isto ocorre^{53,54}.

Entre outras causas de infertilidade, a doença pélvica inflamatória, patologia de etiologia multifatorial, tem no *Mycoplasma hominis* comprovadamente um de seus agentes etiológicos⁹⁰.

A presença de micoplasmas na placenta, causando corioamnionites, pode conduzir ao dano de suas múltiplas funções, principalmente no que se refere à proteção do feto às adversidades físicas, à rejeição imunológica, indicando portanto fortemente sua associação aos resultados anormais da gestação^{75,118}.

Ainda associados a esses microrganismos, podem ser citados casos de prostatites, com reações inflamatórias ascendentes da uretra para a próstata^{13,133}.

Pacientes com sintomas agudos de infecção do trato urinário tiveram micoplasmas como os únicos microrganismos isolados do jato médio de urina, bem como da urina obtida através de punção suprapúbica, reforçando que estes podem também estar associados aos casos de infecção urinária⁸⁹.

Culturas puras de *Mycoplasma hominis* foram obtidas de pacientes com pielonefrite aguda, evidenciando c

seu papel de patógeno primário nesta patologia, uma vez que testes sorológicos sustentam esta conclusão¹²⁸.

Finalmente, tem sido atribuído aos micoplasmas, sobretudo ao *Ureaplasma urealyticum*, participação efetiva nos casos de Síndrome de Reiter⁷⁰, bem como na produção de cálculos urinários⁵¹ e de outros estados mórbitos.

OBJETIVO:

O presente trabalho teve como finalidade precípua, na primeira fase, padronizar meios de cultivo para o isolamento e manutenção do *Mycoplasma hominis* e do *Ureaplasma urealyticum*, bem como provas bioquímicas e sorológicas para a identificação dos mesmos. A introdução de algumas modificações possibilitaria a sua pesquisa na rotina laboratorial diagnóstica, ainda em nosso meio bastante limitada pelas dificuldades técnicas e de aquisição de alguns componentes essenciais de origem estrangeira.

O trabalho teve também como objetivo, em segunda instância, a verificação das taxas de colonização de *Mycoplasma hominis* e de *Ureaplasma urealyticum* no oérvis de gestantes, uma vez que a literatura internacional traz uma série de registros envolvendo os micoplasmas, sobretudo *Ureaplasma urealyticum*, em casos de repetidos abortos espontâneos, nascimentos de prematuros, natimortos, além de várias outras

alterações materno-fetais. Devido ao fato do próprio estado gestacional tornar as gestantes um grupo bastante susceptível às infecções microbianas, devido às variações hormonais, de pH e do próprio epitélio endometrial, a implicação da colonização micoplásmica no cérvix despertou interesse dada a importância de seu possível papel patogênico nas alterações peri-gestacionais.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material Cervical

A amostra clínica utilizada foi o material cervical de gestantes pertencentes a uma classe de baixo nível sócio-econômico, que acorreram ao ambulatório de obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a fim de terem acompanhamento clínico durante o período gestacional.

Fizeram parte do grupo de estudo setenta e quatro gestantes, das quais trinta e sete possuíam histórico anterior de alterações gestacionais, tais como: abortos, natimortos, prematuros e malformados, que constituíram o grupo de risco. As outras trinta e sete gestantes que não haviam apresentado anteriormente qualquer problema gestacional fizeram parte do grupo controle.

Desse total de gestantes, sessenta e duas apresentaram seguimento até o término da gestação, possibilitando assim obter dados referentes ao produto conceptual.

Dentre as gestantes do grupo de risco, quinze apresen

tavam alterações gestacionais clinicamente definidas (onze com incompetência ístmo cervical, duas com ovário policístico, uma com útero bicórnico e uma com útero hipoplásico).

Antes da coleta do material clínico propriamente dito, o conteúdo vaginal era colhido com auxílio de solução fisiológica estéril, material este utilizado para o exame a fresco.

O material cervical foi obtido com o auxílio de dois "swabs" alginatados neutros, de uma região denominada fundo de saco de Douglas. Um dos "swabs" foi colocado em meio de transporte MLTr, em banho de gelo, até seu processamento e o outro foi utilizado para a feitura de lâminas para a bacterioscopia pelas colorações de Gram e de Giemsa.

O processamento das amostras clínicas assim colhidas foi o seguinte:

A partir do meio MLTr, três alíquotas de 0,1mL
foram semeadas do seguinte modo:

- A primeira alíquota de 0,1mL do meio de transporte foi semeada diretamente em meio sólido MSM e incubada à 37°C por 24 horas em microaerofilia. Observado o crescimento de colônias de micoplasmas, blocos com crescimento foram cortados e congelados no respectivo meio líquido (MLA ou MLU).
- A segunda alíquota de 0,1mL foi colocada em meio MLU, o qual foi incubado a 37°C em microaerofilia por 18 a 24 horas. Verificada a alteração do pH, pela mudança de cor do

meio de amarelo para róseo, 0,1mL do mesmo foi semeado em meio sólido MSM, o qual foi incubado a 37°C por 24 horas em microaerofilia. A observação microscópica do meio sólido MSM (com aumento de 100x) e a constatação de colônias pequenas de coloração marron dourado, caracterizava a presença de *Ureaplasma urealyticum*. Pequenos blocos, com crescimento do microrganismo, foram cortados e com eles, utilizando-se a técnica "pushing block" (que será descrita oportunamente), realizavam-se as provas de sensibilidade à digitonina, e as provas bioquímicas de fosfatase, da utilização da glicose, da redução de tetrazólio em aerobiose e anaerobiose. A prova da formação de filmes e "spots" foi realizada da partir de 0,1mL do meio líquido MLU em que havia crescimento.

- E finalmente foi inoculado em meio líquido MLA e incubado à 37°C em microaerofilia por 24 a 48 horas. A variação de pH, pelo aparecimento de cor púrpura, além da turvação do meio, denotavam crescimento de micoplasmas que se utilizavam de arginina como substrato.

A partir desse meio líquido MLA foi semeado 0,1mL para outro tubo de meio líquido de MLA e congelado (para manutenção das cepas). Outra alíquota de 0,1mL foi semeada em meio sólido MSM e, após incubação por 24-48 horas a 37°C em microaerofilia, foi feita a observação microscópica da placa de meio MSM a fim de se observar a presença ou não de colônias tipo "ovo frito". Em caso positivo, pequenos blocos contendo essas colônias foram recortados e com eles realizadas provas de sensibilidade à digitonina 1,5% e as pro

vas bioquímicas de utilização de glicose, de redução do te trazólio em aerobiose e anaerobiose, e da fosfatose. O teste da formação de filmes e "spots" foi realizado a partir da semeadura de 0,1mL do meio MLA com crescimento, em meio sólido MSPFS.

O esquema do processamento é o que segue:

ESQUEMA DO PROCESSAMENTO DA AMOSTRA CLÍNICA

2.2 - MEIOS DE CULTURA

No presente trabalho estão descritas todas as formulações dos meios originais e modificados, bem como as técnicas de semeadura e cultivo dos micoplasmas, a fim de fornecer subsídios aos que pretendem desenvolver estudos sobre esses microrganismos.

Os meios utilizados para o crescimento, isolamento e caracterização dos microrganismos pertencentes à família *Mycoplasmataceae*, tiveram como base alguns meios utilizados por SHEPARD^{113,114} e ALUOTTO², aos quais foram introduzidas algumas modificações a fim de adaptá-los às nossas condições de trabalho.

2.2.1 - Meio Líquido de Transporte — MLTr

Este meio foi utilizado para o transporte das amostras clínicas e baseou-se no meio A3 x b preconizado por SHEPARD¹¹⁴. Sua composição, com algumas modificações, é a seguinte para 100 mL p/v:

Digestão pancreática de caseína	1,7 g
Digestão papaica de soja	0,3 g
Dextrose	0,25g
Cloreto de sódio	0,50g
Fosfato dipotássico	0,25g

Água deionizada e bidestilada 99 g

Cloridrato de L-cisteína, estéril,
solúvel 5 4% 0,25 mL

— Após autoclavagem a 121°C por 20 minutos, foram adicionados esterilmente:

Fração de soro PPL0 1 mL**

Anfotericina B 2,5µg/mL**

Penicilina G potássica 1.000 U.I./mL**

O pH do meio foi ajustado para 6,0 utilizando-se solução de HCl 2N.

** As alterações processadas foram as seguintes: introdução de fração de soro, da anfotericina B e da penicilina G potássica.

O material clínico colhido com "swab" foi inoculado imediatamente no meio de transporte MLTr e mantido em banho de gelo até o momento da semeadura em meio sólido.

2.2.2 - Meio líquido utilizado para cultivo do *Ureaplasma urealyticum* MLU

A elaboração deste meio baseou-se no meio U10 reportado por SHEPARD¹¹³, ao qual introduziu-se uma pequena modificação, ficando sua composição para 100 mL(p/v) a seguinte:

Caldo PPL0 1,47g
 Água deionizada e bidestilada 70 mL

— O pH do meio foi ajustado para 5,5 com solução de HCl 2N.

Após a autoclavagem a 121°C por 20 minutos foram adicionados esterilmente, os seguintes elementos:

Soro estéril e normal de cavalo 20 mL
 Extrato de levedura à 25% 10 mL
 Cloridrato de L-cisteína à 2% 0,5 mL
 Solução de uréia à 10% 0,5 mL
 Suplemento VX 1,0mL**
 Penicilina G potássica 1.000 U.I./mL
 Vermelho de fenol à 1% 0,1 mL

O pH final do meio ajustado para 6,0 com solução de HCl 2N.

** Como modificação do meio original introduziu-se o suplemento VX.

Foi inoculado 0,1mL do meio MLTr contendo a amostra clínica, no meio MLU, o qual foi incubado à 37°C em microaerofilia.

O crescimento do *Ureaplasma Urealyticum* neste meio foi evidenciado pela turvação característica do meio e pela mudança da cor de amarelo para púrpura, o que ocorria após 18-24 horas de incubação, devido à elevação do pH decorrente da hidrólise da uréia através da urease, resultando na produção de amônia. Constatado o crescimento, repiques foram feitos para outros tubos de meio MLU e para

meio sólido MSM com a finalidade de manutenção da cepa e de isolamento das colônias de ureaplasmas, respectivamente.

2.2.3 - Meio líquido para cultivo de *Mycoplasmas* no trato geniturinário, que hidrolizam a arginina, tais como: *Mycoplasma hominis* e *Mycoplasma fermentans*: MLA

Este meio foi empregado conforme recomendações do LDMI¹⁰³ (Laboratory of Diagnosis of Mycoplasmas Infections), tendo-se suprimido da formulação original a Polimixina, a Anfotericina B e a Eritromicina; ficando a sua composição como se segue:

Caldo PPL0	1,4g
Água deionizada e bidestilada	70 mL
— Após a autoclavagem à 121°C por 15 minut. foram adicionados de modo estéril:	
Soro estéril e normal, de cavalo	20 mL
Extrato de levedura à 25%	10 mL
Cloridrato de L-arginina (solução à 30%)	0,66mL
Suplemento VX	1,0mL*
Vermelho de fenol à 2%	0,1 mL
Penicilina G potássica	1.000 U.I./mL

O pH final do meio foi ajustado para 7,0 solução de NaOH 1N.

* Introduziu-se à fórmula o suplemento VX.

Após semeadura de 0,1mL do meio contendo o inóculo no meio MLA, o mesmo foi incubado à 37°C por 24-48 horas em microaerofilia. Os micoplasmas que possuíam o sistema enzimático, arginina desidrolase, hidrolizaram a arginina com produção de amônia, acarretando uma elevação do pH, com consequente alteração da cor do meio, de róseo à púrpura. Esta alteração de cor em conjunto com a turvação do mesmo caracterizava o crescimento

2.2.4 - Meio líquido empregado na determinação da fermentação da glicose: MLG

Este meio baseou-se no preconizado por ALUOTTO² e sua composição foi a seguinte:

Caldo de cérebro e coração	3,26g
Água deionizada e bidestilada	88 mL
- O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos. Adicionou-se posteriormente de maneira estéril:	
Fração de soro PPL0	1,5mL ^a
Glicose, solução estéril à 10%	10 mL
Vermelho de fenol, solução à 1%	0,5 mL

O pH do meio foi ajustado para 7,6 com auxílio de solução de NaOH 1N.

Blocos cortados do meio sólido contendo crescimento do micoplasma, foram colocados neste meio e o mes

mo incubado a 37°C por 24-48 horas.

a Para evitar-se qualquer queda de pH, devido a uma metabolização pelos micoplasmas de outros produtos que não a glicose, foi suprimido do meio básico o extrato de levedura e introduzida a fração de soro PPLO em lugar do soro total de cavalo¹⁰¹.

A adição de vaselina estéril ao tubo de MLG contendo o micoplasma em estudo, teve como finalidade proporcionar condições de anaerobiose para que ocorresse a fermentação da glicose, evidenciada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo, como resultado da formação de ácido.

2.2.5 - Meio sólido utilizado no isolamento de *Ureaplasma urealyticum* e de outros micoplasmas genitais: MSM

O meio utilizado foi o meio A7 de SHEPARD¹¹⁴.

Sua composição para 100 mL de meio(p/v) foi a seguinte:

Caldo PPLO	2,1 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0150g
Água deionizada e bidestilada	63 mL

- O pH foi ajustado entre 5,5 e 6,0 utilizando-se solução de HCl 2N. A seguir adicionou-se:

Ágar Noble	1,0 g
------------------	-------

- Após a autoclavagem a 121°C por 15 minutos foram adicionados esterilmente:

Soro estéril e normal de cavalo	20	mL
Extrato de levedura à 25%	10	mL
Solução de uréia à 10%	1	mL
Solução de glicose à 10%	5	mL
Suplemento VX	1,0	mL*
Penicilina G potássica	1.000	U.I./mL

* Foi adicionado à formulação original o suplemento VX.

Após a semeadura de 0,1mL do material clínico contido em meio MLTr, no meio sólido MSM, o mesmo foi incubado à 37°C em microaerofilia.

O aparecimento, neste meio, de colônias com aspecto de "ovo frito", após 48-72 horas era indicativo de provável presença de micoplasmas. Os ureaplasmas foram evidenciados pela morfologia colonial característica de colônias pequenas de cor marrom-dourado devido à formação de MnO_2 em presença de amônia proveniente da degradação da uréia pela ação da urease, em 18-24 horas após semeadura.

2.2.6 - Meio sólido utilizado para a redução do tetrazólio: MSTz⁽²⁾

A composição deste meio para 100mL(p/v) foi a que segue:

Ágar infusão de coração 2,96g

Água deionizada e bidestilada 74 mL

— Após autoclavagem por 15 minutos à 121°C, adicionam-se esterilmente:

Soro estéril e normal de cavalo 20 mL

Extrato de levedura, solução à 25% 5 mL

Solução à 2% de 2,3,5 cloreto de
trifeniltetrazólio 1 mL

O pH final do meio foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1N.

A identificação presuntiva foi feita baseando-se na capacidade que certos micoplasmas possuem, de reduzir o 2,3,5, cloreto de trifeniltetrazólio, dando origem a um composto vermelho tijolo=(formazan).

A prova foi executada tanto em aerobiose como em anaerobiose e a técnica de semeadura foi a denominada "pushing block", que consistia em recortar pequenos blocos do meio MSM com crescimento e com a face contendo o micoplasma voltada para baixo, "deslizando-os" sobre a superfície do meio MSTz.

O aparecimento de uma cor vermelho tijolo em dois a três dias, ao redor da área do bloco com crescimento era considerada reação positiva.

2.2.7 - Meio sólido utilizado para a determinação da atividade da fosfatase: MSAF

Este meio baseou-se no inicialmente descrito por ALUOTTO em 1970², com uma modificação no substrato: a fenolftaleína difosfato de sódio sendo substituída pelo p-nitrofenilfosfato e mantendo-se a estequiometria da reação.

A composição final para 100 mL(p/v) foi a que se segue:

Caldo PPL0	2,0 g
Água deionizada e bidestilada	63 mL
- O pH foi ajustado para 5,5 a 6,0 com solução de HCl 2N	
Ágar Noble	1 g
- Após autoclavagem à 121°C por 15 minutos foram adicionados esterielmente ao meio:	
Soro estéril e normal de cavalo	20 mL (b)
Extrato de levedura à 25%	10 mL (c)
Solução de p-nitrofenilfosfato à 1,7%	0,5 mL**
Suplemento VX	1,0 mL**
Solução de uréia à 10%	1,0 mL
Penicilina G potássica	1.000 U.I./mL

** Como modificações do meio original, citam-se o p-nitrofenilfosfato e o suplemento VX.

(b) e (c) Tanto o soro de cavalo como o ex-

trato de levedura foram aquecidos por 1 hora à 60°C antes de serem adicionados ao meio, a fim de inativar quaisquer eventuais fosfatases presentes nesses componentes.

Após a incubação em microaerofilia à 37°C por 3 a 4 dias, em caso de reação positiva observa-se o aparecimento de cor amarelo-acastanhada nas áreas de crescimento. A semeadura do micoplasma, cuja atividade da fosfatase estava sendo testada, foi feita utilizando-se a técnica do "pushing block" descrita anteriormente.

2.2.8 - Meio sólido utilizado para a detecção da formação de filmes e "spots" - MSFFS

Deste meio, descrito por FREUNDT⁴⁴, foram superiores alguns componentes e sua composição ficou a seguinte:

Ágar infusão de coração 3,6 g

Água deionizada e bidestilada 90 mL

- Após a autoclavagem à 121°C por 20 minutos e resfriamento do meio à aproximadamente 50°C foram adicionados de modo estéril:

Soro estéril e normal de cavalo 20 mL

Emulsão de gema de ovo 13,6mL(g)

(g) A emulsão de gema de ovo foi preparada pela adição de um volume de emulsão concentrada de gema de ovo a um volume de solução de NaCl a 0,9%. Foi suprimida do meio original a adição de DNA, acetato de sódio e penicilina.

A semeadura do micoplasma em estudo, no meio MSFFS, foi feita a partir de 0,1 mL do cultivo em meio líquido, ou de 0,1 mL de caldo de cultura contendo blocos com crescimento, previamente incubado nas condições ideais de semeadura por 72 horas.

Uma vez semeado o micoplasma em estudo nesse meio (MSFFS), e incubado por dois a três dias à 37°C em microaerofilia, a reação foi considerada positiva quando se observava o fenômeno da formação de filmes e "spots".

— Verificação sobre condições de preparo de alguns dos componentes dos meios líquidos e sólidos:

a) O soro de cavalo empregado nos vários meios foi inativado à 56°C por 30 minutos e filtrado em membrana Millipore 0,20 µm de diâmetro de poro.

b) O extrato de levedura à 25% foi elaborado de acordo com a técnica preconizada pelo Laboratory Diagnosis of Mycoplasma Infections.

c) As soluções de uso bem como as substâncias para enriquecimento, antes de serem incorporadas aos meios, foram todas esterilizadas através da filtração em membranas Millipore 0,2 µm.

d) Os meios líquidos preparados foram, depois de prontos, filtrados em membranas Millipore 0,20 µm e distribuídos em alíquotas de 3 mL, em tubos (130 mm por 10 mm), rosqueados com tampa de baquelite. De cada partida de meio, um tubo foi incubado nas condições de semeadura (estufa à 37°C e

jarra com vela) para teste de esterilidade.

e) Todos os meios sólidos preparados foram distribuídos em placas estéreis (60mm por 12mm). Uma placa de cada partida do meio foi incubada nas mesmas condições de semeadura para controle de esterilidade.

2.3 - TESTE DE SENSIBILIDADE À DIGITONINA

Uma vez estabelecidos os meios mais adequados que permitiram o isolamento dos micoplasmas a partir das amostras clínicas, foi utilizado o teste de sensibilidade à Digitonina à 1,5%. Este teste foi realizado por se constituir um elemento essencial, embora indireto, na identificação e classificação taxonômica destes microrganismos, podendo desta maneira separar os acholeplasmas (saprófitas que não necessitam de esteróis) de outros micoplasmas, incluindo as espécies dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* as quais requerem esteróis para o crescimento.

Para a realização dessa prova, utilizou-se a metodologia empregada por FREUNDT⁴⁶ como segue:

- Discos de papel de filtro de 6mm de diâmetro foram embebidos com 20µL de uma solução etanólica de digitonina à 1,5%. Os discos assim preparados foram colocados em estufa à 37°C por 24 horas até a evaporação completa do álcool. Uma vez secos, os discos foram armazenados à 4°C em fras-

- Os microrganismos isolados, na fase logarítmica de crescimento foram semeados em meio MSM e discos de digitonina à 1,5%, foram colocados sobre a superfície da placa, a qual foi incubada nas condições ótimas de crescimento. A leitura foi feita quando as colônias tornaram-se visíveis sob microscopia de luz oblíqua.

- A largura da zona de inibição foi medida em mm, sendo considerados sensíveis quando os diâmetros da zona de inibição, apresentavam-se maiores ou iguais a 5mm⁴⁶.

- Como controle do teste, foram feitas duplicatas das placas inoculadas, colocando-se discos, não impregnados com digitonina, sob as mesmas condições de crescimento simultaneamente com as placas que estavam sendo testadas. Nestas, o crescimento foi verificado por toda a placa, inclusive ao redor do disco.

Após o isolamento dos micoplasmas e a realização do teste de sensibilidade à digitonina prosseguiram-se os estudos com a identificação bioquímica dos mesmos, utilizando-se as seguintes provas:

- Fermentação da Glicose
- Hidrólise da Arginina
- Atividade da Fosfatase
- Formação de Filmes e "Spots"
- Redução do Tetrazólio em Aerobiose e Anaerobiose
- Atividade da Urease

Para tanto usamos os seguintes controles:

Fermentação da Glicose

- a) Controle positivo: *M. fermentans* ATCC 19989
- b) Controle negativo: *M. hominis* ATCC 23144

Redução do Tetrazólio

- a) Controle positivo (ae): *M. pneumoniae* ATCC 15492
- b) Controle negativo (ae/an): *M. hominis* ATCC 23114

Hidrólise da Arginina

- a) Controle positivo: *M. hominis* ATCC 23114
- b) Controle negativo: *M. pneumoniae* ATCC 15492

Prova da Atividade da Urease

- a) Controle positivo: *U. urealyticum* ATCC 27619
- b) Controle negativo: *M. hominis* ATCC 23114

Formação de Filmes e "Spots"

- a) Controle positivo: *M. fermentans* ATCC 19989
- b) Controle negativo: *M. hominis* ATCC 23114

Além dos controles positivo e negativo, foram incubadas nas condições de semeadura, placas de meio sem inóculo, como controle de meio.

Realizadas as provas bioquímicas, a identificação final do microrganismo foi possível com a utilização de anti-soros específicos nas reações imunológicas.

O anti-soro para *M. hominis* foi obtido através de imunizações de coelhos utilizando-se a cepa padrão de *Mycoplasma hominis* ATCC 23114.

2.4 - OBTENÇÃO DO ANTI-SORO

Preparo do Antígeno

O antígeno foi obtido fazendo-se o cultivo da cepa padrão *Mycoplasma hominis* em meio líquido MLA que teve o soro de cavalo substituído pela fração de soro PPLO (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.) a fim de se evitar uma possível formação de anticorpos heterólogos. Repiques sucessivos da cepa padrão em vários frascos de meio MLA propiciou um crescimento na concentração antigênica de $1,27 \times 10^7$ UFC/mL. Após a obtenção de aproximadamente 500 mL de cultura do microrganismo, este foi centrifugado à 5.000 g a 4°C, por 1 hora. Após a centrifugação, o sedimento assim obtido foi lavado 3 vezes em solução salina tamponada com fosfatos (SST) pH 7,2 (0,01M) a fim de que todo e qualquer traço de meio fosse removido.

Uma vez lavado, o sedimento foi ressuspenso em SST, em concentração ajustada à escala 3 de Mc Farland.

O antígeno assim preparado foi utilizado para a imunização dos coelhos.

2.4.1 - Imunização dos coelhos

Foram utilizados dois coelhos albinos com 07 meses de idade da raça Nova Zelândia. Adotou-se o esquema de imunização descrito por PERREAU⁹⁶:

- Colheu-se uma amostra de sangue dos coelhos antes das imunizações, a fim de verificar se estes já possuíam anticorpos anti-*M. hominis*. Como não apresentavam anticorpos, os soros foram utilizados como controle negativo.
- A imunização foi feita com emulsão obtida de mistura em partes iguais de adjuvante incompleto de FREUNDT e suspensão de micoplasma (aproximadamente 2 mL para cada coelho, sendo 1 mL do adjuvante e 1 mL do antígeno).
- A mistura assim obtida foi utilizada para injeções subcutâneas na região do gradil costal, onde um total de 6 pontos foram inoculados sendo 3 de cada lado.
- Quatro semanas após, iniciou-se uma série de 7 injeções intravenosas, uma por semana, apenas com a suspensão do antígeno.
- Após a quinta inoculação foi feita a primeira sangria. Dando continuidade ao esquema, nas semanas seguintes reiniciaram-se as inoculações até perfazer o total de 7 injeções intravenosas.

- Uma semana após a última imunização, os coelhos foram sangrados e procedeu-se a titulação dos soros.

2.4.2 - Titulação dos soros imunes obtidos

A titulação dos soros imunes obtidos foi feita utilizando-se a técnica de inibição metabólica (TIM) descrita por PURCELL⁹⁷.

Esta técnica consiste na capacidade do soro em inibir o crescimento, com conseqüente inibição do metabolismo dos micoplasmas em meio líquido contendo substrato específico para a espécie. O produto da metabolização desse substrato, o qual altera o pH do meio, é visualizado pela variação da cor do indicador utilizado (vermelho de fenol). Assim, na presença de anticorpos específicos ocorria a inibição do crescimento dos micoplasmas, reconhecida pela ausência de variação de cor.

Para a titulação de soros anti- *M. hominis* o meio líquido utilizado foi o MLA cuja concentração de clo-
ridrato de l-arginina foi de 0,5% (substrato da espécie).

Inicialmente procedeu-se à titulação do antígeno, a fim de se determinar uma concentração de uso para a realização da técnica de inibição metabólica. A partir de diluições seriadas do antígeno em meio de cultura, após a incubação nas condições ideais de semeadura, (37%-48hs.)

avaliou-se a maior diluição capaz ainda de promover crescimento, com conseqüente mudança de cor.

2.4.3 - Técnica de Inibição Metabólica

Para a realização do teste de inibição metabólica utilizou-se o antígeno numa concentração quatro vezes superior à mais alta diluição que procedia a mudança de cor.

Uma vez padronizada a concentração do antígeno, procedeu-se a realização do teste propriamente dito:

- 1 - Em uma placa de plástico de microtitulação de fundo chato, estéril, colocou-se uma gota (25µL) do meio MLA em cada escavação desde a primeira até a sétima da primeira fileira, e na nona, como controle do meio.
- 2 - Acrescentou-se uma gota (25µL) do soro a ser titulado (inativado a 56°C - 30 minutos) somente na primeira e décima escavação (controle do soro).
- 3 - Procedeu-se à diluição do soro, passando-se 25 µL da primeira até a sétima escavação, homogeneizando-se a cada passagem.
- 4 - Foi colocado a seguir duas gotas (50 L) do antígeno previamente titulado e diluído em caldo PPLO, em cada escavação, exceto no controle do soro e no controle do meio.

5 - Após a agitação, a placa foi fechada e incubada a 37° por dois a três dias em jarra com vela, quando foi feita a leitura.

A presença de anticorpos foi detectada nas escavações em que não foi constatada a alteração da cor do meio, o que significa a inibição do crescimento com consequente inibição metabólica.

Nas demais, onde a cor passou de róseo-claro à púrpura, ficava evidenciada a ausência de anticorpos.

Verificados todos os controles e constatado que o sistema apresentou pleno funcionamento, o título foi dado pela maior diluição do soro em que não houve alteração da cor do meio.

A titulação dos imunerosos obtidos através de imunizações, apresentaram baixos títulos e portanto decidiu-se utilizá-los puros para realização das provas sorológicas.

2.5 - IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DOS MICOPLASMAS ISOLADOS DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

A caracterização dos micoplasmas isolados foi feita utilizando-se as técnicas de inibição metabólica⁹⁷ e de imunodifusão dupla em gel de ágar^{79,93}.

A imunodifusão dupla tem como finalidade demonstrar

a identidade entre sistemas precipitantes e que tem como fundamento a difusão, no ágar, de substâncias solúveis (antígeno e anticorpo) com precipitação na zona de equivalência.

Para tanto, a obtenção dos antígenos na forma solúvel foi o próximo passo para a realização da imunodifusão dupla.

2.5.1 - Preparo do antígeno padrão na forma solúvel

Após o cultivo da cepa padrão de *M. hominis* ATCC 23114 em meio líquido MLA, várias passagens sucessivas foram feitas até a obtenção de 500mL de cultura de *M. hominis* com uma concentração de $1,27 \times 10^7$ U.F.C./mL.

Este volume foi dividido em tubos com capacidade de 40 mL, por facilidades técnicas.

A seguir, foi feita a centrifugação dos mesmos a 5.000 g por uma hora e os sedimentos assim obtidos foram lavados três vezes com SST (solução salina tamponada pH 7,2 - 7,4). Uma vez eliminado todo e qualquer traço de meio de cultura, os sedimentos foram ressuspensos em SST, até que se obtivesse uma turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de Mc Farland.

A fim de se obter o antígeno solúvel, procedeu-se ao rompimento celular, através da técnica de conge-

lamento e descongelamento da suspensão obtida, aliquotada em vários tubos.

O congelamento foi realizado mergulhando o antígeno em nitrogênio líquido e o descongelamento era feito colocando-se os tubos imediatamente em banho-maria a 37°C. A operação foi repetida várias vezes até o rompimento total das células.

O conteúdo dos tubos foram misturados e homogeneizados a fim de se determinar a concentração protéica, o que foi feito pelo método de LOWRY⁸¹. A concentração protéica do antígeno padrão de *M. hominis* determinada foi de 1,5 mg/mL.

2.5.2 - Preparo dos antígenos solúveis, a partir dos micoplasmas isolados das amostras clínicas

O mesmo procedimento utilizado para a obtenção do antígeno solúvel da cepa padrão de *M. hominis*, foi empregado para a obtenção dos antígenos solúveis isolados das amostras clínicas, partindo-se contudo de 100mL de cultura de cada antígeno. As dosagens protéicas dos antígenos das amostras variaram de 1,46 mg/mL a 1,70 mg/mL.

De posse dos antígenos na forma solúvel (ANTÍGENO PADRÃO E ANTÍGENO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS) e ainda do anti-soro anti *M. hominis*, procedeu-se à realização da reação de imunodifusão dupla de OUCHTERLONY para cada micoplas

ma isolado.

2.5.3 - Imunodifusão dupla de OUCHTERLONY⁹⁵

A metodologia empregada para a realização da imunodifusão dupla de Ouchterlony foi a seguinte:

- Lâminas de microscopia, bem limpas, foram recobertas com 1 mL de ágar à 1% em água destilada.
- A seguir, as mesmas foram secas em estufa à 37°C por 24 horas.
- As lâminas assim preparadas foram recobertas com 3 mL de de ágar a 1% em solução fisiológica adicionada de mertiolato 1/10000.
- Após a solidificação das mesmas, o ágar foi perfurado fazendo-se sete orifícios, sendo um central e os demais destribuídos simetricamente ao redor.
- No orifício central foi colocado o soro anti *M. hominis* e nos demais orifícios foi intercalado o antígeno padrão com os antígenos das amostras.
- As lâminas assim preparadas foram deixadas difundir em câmara úmida, por 48 horas à temperatura ambiente.
- A seguir, as mesmas foram lavadas com solução fisiológica, realizando-se trocas frequentes (no mínimo de 6), por 48 horas.

- Após as lavagens, as lâminas, embrulhadas previamente em papel de filtro umedecido, foram secas em estufa à 45°C.
- Uma vez secas, estas foram coradas durante 10 minutos utilizando-se o Ponceau como corante. A seguir procedeu-se à lavagem das lâminas com solução de ácido acético 5% a fim de remover o excesso do corante.

Leitura e interpretação da reação

Em caso de identidade antigênica entre o micoplasma padrão e os provenientes das amostras clínicas em presença do soro anti *M. hominis*, havia a formação de uma linha contínua circular de precipitação.

Em caso dos antígenos serem diferentes entre si, as linhas de precipitação formadas para cada antígeno, apresentariam configuração diferente daquela observada em caso de identidade.

Além da realização de imunodifusão dupla, os micoplasmas das amostras foram também identificados através da reação de inibição metabólica já descrita anteriormente no item 2.5.3.

2.6 - TESTE ESTATÍSTICO

O teste estatístico empregado para a avaliação das proporções de isolamento do *Ureaplasma urealyticum* e de *M. hominis* nas gestantes pertencentes aos grupos de Risco e Controle, foi o de "Comparação de duas proporções independentes"²¹, utilizando-se um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

3 - RESULTADOS

3.1 - Padronização Técnica

Todas as modificações introduzidas nos diferentes meios de cultivo, de transporte, bem como na identificação bioquímica e sorológica, estão apresentados no capítulo de Material e Métodos nas suas formas definitivas, para facilitar aos pesquisadores e profissionais interessados a implantação ou utilização dos referidos métodos e obtenção de resultados satisfatórios.

Assim, foi possível isolar o *M.hominus* e o *U.urealyticum* do material cervical e identificá-los através da morfologia colonial característica, da prova da sensibilidade à digitonina a 1,5%, do comportamento bioquímico frente a alguns substratos e conclusivamente através da sorologia com as reações de imunodifusão dupla e da reação de inibição metabólica.

Os micoplasmas isolados apresentaram as seguintes características, expressas no Quadro I:

QUADRO I

Características morfológicas e bioquímicas dos
micoplasmas isolados de amostras clínicas

Características	micoplasmas isolados	
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
Morfologia colonial no meio MSM	Colônias "T"*	Colônias com aspecto de "ovo frito"
Sensibilidade à digitonina	S	S
Metabolização da glicose	-	-
Hidrólise da arginina	-	+
Prova de atividade da urease	+	-
Prova de atividade da fosfatase	+	-
Produção de filmes e "spots"	-	-
Produção de tetrazólio em ae/an	-	-

* T = Colônias diminutas apresentando coloração marrom dourado

S = Sensível

(-) = Negativo

(+) = Positivo

3.2 - Identificação das espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* nas amostras clínicas

A caracterização do *Ureaplasma urealyticum* foi feita pela observação da morfologia colonial característica no meio MSM e através de provas bioquímicas. No meio MSM o *Ureaplasma urealyticum* apresentou-se como colônias diminutas de coloração marrom dourado conforme ilustradas nas figuras 1 e 2. A atividade da fosfatase foi positiva como o é sempre para este gênero, apesar de não ser exclusiva, uma vez que outros micoplasmas genitais também a possuem. As provas de metabolização da glicose, hidrólise da arginina, prova de redução do tetrazólio e formação de filmes e "spots" foram sempre negativas. Todas as culturas de *Ureaplasma urealyticum* mostraram-se sensíveis à digitona. A prova mais importante, entretanto, na identificação do *Ureaplasma urealyticum* foi a da atividade da urease, pois dentre os *Micoplasmatales* apenas o gênero *Ureaplasma* tem essa atividade.

Todos os microrganismos isolados do material clínico, que apresentavam as características acima, foram identificados como *Ureaplasma urealyticum*.

A identificação presuntiva dos *M. hominis* foi feita pela morfologia colonial característica com aspecto de "ovo frito" no meio MSM (figura 3), e pelo comportamento bioquímico. Todos os isolados apresentaram: sensibilidade à digitonina, prova de arginina positiva, e as seguintes provas negativas: metabolismo da glicose, da atividade da urease

Fig. 1 - Colônias de *Ureaplasma urealyticum* em meio sólido MSM (Aumento de 100x)

Fig. 2 - Colônias de *Ureaplasma urealyticum* sobre a superfície de células epiteliais da mucosa servical. (Aumento de 400x)

Fig. 3 - Colônias de *Mycoplasma hominis* em meio sólido MSM.
(Aumento de 100x)

Fig. 4 - Prova de Inibição Metabólica empregada na titulação
do soro ímune obtido, bem como na identificação dos
micoplasmas isolados.

(CS=controle do soro; CM=controle do meio MLA)

Fig. 5 - Imunodifusão dupla de OUCHTERLONY em gel de ágar. Linha de identidade podem ser observadas ao redor do orifício central contendo soro imune anti- *M. hominis*.

Fig. 6 - Prova utilizada na detecção do fenômeno de Formação de filmes e "spots". A = controle negativo e B = controle positivo - *M. fermentans* 19989 ATCC

e da atividade da fosfatase, da redução do tetrazólio, e da formação de filmes e "spots" conforme figura 6. A identificação final do *M. hominis* foi feita somente após os testes sorológicos de imunodifusão dupla e de inibição metabólica, os quais podem ser observados nas figuras 4 e 5 respectivamente.

3.3 - Isolamento do *Ureaplasma urealyticum* e do *Mycoplasma hominis* em amostras clínicas

Na tabela I podem ser observados os resultados do isolamento de micoplasmas de amostras clínicas de 74 (setenta e quatro) gestantes estudadas, sendo 37 (trinta e sete) pertencentes ao grupo de risco e 37 (trinta e sete) ao grupo controle. Das amostras clínicas colhidas de trinta e sete gestantes do grupo de risco, vinte e uma (56,8%) foram positivas para *Ureaplasma urealyticum*, duas (5,4%) para *Mycoplasma hominis* e de seis (16,2%) pacientes puderam ser isolados ambos os microrganismos: *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*. Nesse grupo oito amostras (21,6%) mostraram-se negativas para a pesquisa de micoplasmas. No grupo controle foram isoladas dezoito amostras (48,6%) de *Ureaplasma urealyticum*; *Mycoplasma hominis* não foi isolado de nenhuma amostra (0,0%) e em seis pacientes pode ser evidenciada a presença simultânea de ambos os microrganismos. Em treze amostras desse grupo (35,1%), a pesquisa de mico

TABELA I

Frequência de *Ureaplasma urealyticum* e/ou *Mycoplasma hominis*
no trato geniturinário de gestantes

Gestantes do grupo	mi coplasmas isolados		<i>U. urealyticum</i>		<i>M. hominis</i>		<i>U. urealyticum</i> e <i>M. hominis</i>		Negativos		Total
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
Risco	21	56,8	02	5,4	06	16,2	08	21,6	37		
Controle	18	48,6	00	0	06	16,2	13	35,1	37		
Total	39	52,7	02	2,7	12	16,2	21	28,4	74		

— Resultados do isolamento de micoplasma de amostras clínicas de 74 gestantes, sendo 37 pertencentes ao grupo de risco e 37 ao grupo controle.

plasmas resultou negativa. O total de isolamentos de *Ureaplasma urealyticum* nos dois grupos foi portanto de trinta e nove (52,7%); *Mycoplasma hominis* foi encontrado em duas amostras (2,7%) e em doze (16,2%) observamos a presença de ambos. O número de amostras negativas no grupo de risco foi de oito (21,6%) e no grupo controle foi de treze (35,1%), perfazendo um total de vinte e um (28,4%) casos negativos nos dois grupos.

O número total de isolamentos de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* nos grupos estudados está apresentado na tabela II.

Essa tabela traduz o número total de isolamentos de *Ureaplasma urealyticum* e de *Mycoplasma hominis* no grupo de risco e no grupo controle, em 74 amostras.

No grupo de risco foram obtidos: vinte e sete (73,0%) isolamentos de *Ureaplasma urealyticum* e oito (21,6%) isolamentos de *Mycoplasma hominis*, resultando trinta e cinco (94,6%) isolamentos de micoplasma nesse grupo. O grupo controle apresentou: vinte e quatro (65,0%) a isolamentos de *Ureaplasma urealyticum* e seis (16,2%) de *Mycoplasma hominis*, perfazendo trinta (81,2%) isolamentos de micoplasmas no grupo.

Portanto o número total de isolamentos, nos dois grupos, de *Ureaplasma urealyticum* foi de cinquenta e um (68,9%) e de *Mycoplasma hominis* de quatorze (18,9%), resultando sessenta e cinco (87,8%) isolamentos de micoplasmas.

TABELA II

Ureaplasma urealyticum e *Mycoplasma hominis*
isolados do trato geniturinário nos grupos de risco e controle (n=74)

<div> <div>mi coplasmas isolados</div> <div>Gestantes</div> </div>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>		<i>Mycoplasma hominis</i>		Total de isolamentos	
	nº	%	nº	%	nº	%
Grupo de risco	27	73,0	08	21,6	35	94,6
Grupo de controle	24	65,0	06	16,2	30	81,2
Total	51	68,9	14	18,9	65	87,8

-- Número total de isolamentos de *Ureaplasma urealyticum* e de *Mycoplasma hominis* no grupo de risco e grupo de controle.

3.4 - Análise Estatística

A análise estatística das tabelas I e II mostram que:

- A prevalência de *Ureaplasma urealyticum* verificada entre os grupos de risco e controle não foi significativamente diferente, em vista de ter sido encontrado um $Z=0,7$. Portanto, sendo $Z_{\text{crítico}} 2,5\% = 1,96$ nossos achados indicam a inexistência de diferença entre os grupos estudados.
- Para a prevalência do *Mycoplasma hominis* nos referidos grupos, encontramos um $Z=0,6$. Portanto, sendo $Z_{\text{crítico}} > Z_{\text{obtido}}$, podemos verificar que a diferença na proporção de isolamento não foi significativa entre os dois grupos.

Fizeram parte do grupo de risco, gestantes com alterações clinicamente definidas, alterações estas que poderiam ser as causas clínicas do nascimento de prematuros, de natimortos de abortos repetitivos, enfim, dos problemas conceptuais. A pesquisa de micoplasmas nessas gestantes resultou no seguinte: *Ureaplasma urealyticum* foi isolado de seis pacientes com incompetência istmo cervical e uma que possuía útero bicórnico, resultando portanto sete isolamentos de *Ureaplasma urealyticum*.

A associação *Ureaplasma urealyticum* $\leftrightarrow$ *Mycoplasma hominis* pode ser observada em duas pacientes com incompetência istmo cervical e em uma paciente que possuía ovário po

licístico, num total de três isolamentos. Foi negativa a pesquisa de micoplasma em cinco pacientes desse grupo. De um total de 15(quinze) amostras de micoplasmas isolado, onze foram de gestantes com incompetência istmo cervical; duas de gestantes com ovário policístico, uma de gestante com ovário hipoplásico e uma de gestante com útero bicórnico. A tabela III expressa esses resultados.

3.5 - Resultados das gestações das pacientes estudadas

De 62(sessenta e duas) gestantes, do total de 74(setenta e quatro) estudados, foi possível coletar dados quanto aos resultados das gestações que estavam em curso e expressá-los (tabela IV).

Essa tabela permite constatar que dentre as gestantes do grupo de risco, vinte e cinco deram à luz conceptos normais, uma teve um malformado, seis tiveram prematuros, duas geraram natimortos e duas abortaram, perfazendo um total de trinta e seis conceptos das trinta e sete gestantes pertencentes ao grupo.

Como resultado das gestações do grupo controle, somente foram obtidos dados sobre vinte e seis pacientes, e destas, todas deram à luz crianças normais.

O isolamento de micoplasmas e os produtos de concepção no grupo de risco com alterações clinicamente defini-

TABELA III

Isolamento de microrganismos de gestantes
apresentando alterações clínicas do trato genital

alterações em gestantes com problemas clínicos microrganismo isolado	Incompetência istmo cervical	Ovário policístico	Ovário hipoplásico	Útero bicôrnico	Total
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	6	—	—	1	7
<i>Mycoplasma hominis</i>	—	—	—	—	—
<i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Mycoplasma hominis</i>	2	1	—	—	3
Negativo	3	1	1	—	5
Total	11	2	1	1	5

TABELA IV

Dados sobre o produto conceptual nos grupos estudados

<div> <div>resultado da gestação</div> <div>Gestantes</div> </div>	RN normal	Abortos	Natimortos	Malformados	Prematuros*	Total
grupo de risco	25	2	2	1	6	36
grupo controle	26	?	?	?	?	26

— Resultados das gestações que estavam em curso; grupo de risco e controle.

(?)=não há registro

(*)=são considerados prematuros os nascidos com menos de 37 semanas.

das e no grupo sem alterações podem ser observadas nas tabelas V, VI e VII.

A tabela V fornece dados sobre os micoplasmas isolados e os produtos conceptuais das onze gestantes com incompetência istmo cervical.

Dentre as pacientes em que *Ureaplasma urealyticum* foi isolado foram observados os nascimentos de: um prematuro, um malformado e quatro crianças normais, perfazendo um total de seis casos de isolamento de *Ureaplasma urealyticum*. A associação *Ureaplasma urealyticum* ↔ *Mycoplasma hominis* foi observada em uma paciente que deu à luz um natimorto e em um caso de nascimento de prematuro; resultando um total de dois isolamentos. Foi três o número de casos em que a pesquisa de micoplasmas foi negativa.

A tabela VI fornece dados sobre a análise de quatro pacientes que, possuíam como alterações clínicas: útero bicórnio, útero hipoplásico e ovário policístico. Dentre estas, *Ureaplasma urealyticum* foi isolado da paciente com útero bicórnio que deu à luz um natimorto. A presença simultânea de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* foi observada em uma única paciente com ovário policístico e que deu à luz um conceito normal. Não foi isolado micoplasma da paciente com útero hipoplásico, a qual abortou, e tampouco da paciente com ovário policístico que deu à luz uma criança normal.

A tabela VII permite observar a relação entre os micoplasmas isolados e as alterações ocorridas no produto con

TABELA V

Microrganismo isolado de pacientes
com incompetência istmo cervical e seus produtos de gestação

<div>produtos da concepção</div> <div>microrganismo isolado</div>	Natimorto	Prematuro	Aborto	Mal formado	Normal	Total
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	—	1	—	1	4	6
<i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Mycoplasma hominis</i>	1	1	—	—	—	2
Negativo	—	1	—	—	2	3
Total	1	3	0	1	5	11

- Isolamento de micoplasmas e produtos de concepção no grupo de risco com alterações clinicamente definidas e no grupo sem alterações.

TABELA VI

Relação entre as anomalias clínicas e
presença de micoplasmas no trato genital das gestantes

	Alterações clínicas	útero bicórnio	útero hipoplásico	útero policístico	Total
	Produto conceptual	Natimorto	Aborto	Normal	
micoplasma isolado					
<i>Ureaplasma urealyticum</i> ▶	1	—	—	—	1
<i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Mycoplasma hominis</i>	—	—	—	1	1
Negativo	—	1	1	1	2
Total	1	1	1	2	4

- Fornecidos dados de pacientes com alterações clínicas.

TABELA VII

Relação entre micoplasma isolado da mãe e produto da concepção

<div>produto da concepção</div> <div>micoplasma isolado</div>	Prematuro	Aborto	Normal	Total
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	3	1	10	14
<i>Mycoplasma hominis</i>	--	—	1	1
<i>U. urealyticum</i> e <i>M. hominis</i>	—	—	1	4
Negativo	—	—	3	3
Total	3	1	18	22

Esta tabela permite observar a relação entre os micoplasmas isolados e as alterações ocorridas no produto conceptual.

ceptual. De vinte e duas pacientes do grupo de risco que não apresentavam alteração clínica definida que justificasse as anomalias conceptuais, *Ureaplasma urealyticum* foi isolado de três gestantes que tiveram prematuros, de uma que abortou e de dez que geraram crianças normais. A presença de *Ureaplasma urealyticum* e de *Mycoplasma hominis*, simultaneamente, foi verificada em quatro casos de nascimentos normais. Em três gestantes a pesquisa de micoplasmas resultou negativa e os produtos conceptuais foram normais.

3.6 - Relação entre a presença de *Trichomonas* sp e micoplasmas

Ainda foi possível obter resultados adicionais quanto à presença de *Trichomonas* sp observada no exame direto do conteúdo vaginal das gestantes com culturas positivas para *Ureaplasma urealyticum* e/ou *Mycoplasma hominis*.

O estudo de sua prevalência está expresso na tabela VIII.

Portanto, nas 74 (setenta e quatro) gestantes estudadas, a relação entre a presença de micoplasmas e a incidência de *Trichomonas* sp foi a seguinte: em cinqüenta e três gestantes em que micoplasmas foram isolados, *Trichomonas* sp estava presente em onze. Dentre as vinte e uma gestantes em que a presença de micoplasmas foi negativa, três eram portadoras de *Trichomonas* sp. Portanto, dos quatorze casos de

tricomoniase onze estavam associados com micoplasmas. Por outro lado, do total de sessenta casos negativos para a presença de *Trichomonas* sp, quarenta e dois eram positivos para a pesquisa de micoplasmas.

Com a finalidade de avaliar se existe ou não uma correlação entre a presença de *Trichomonas* sp e a positividade de isolamento de micoplasmas, aplicou-se o teste estatístico de comparação de duas proporções; considerando-se um $\alpha = 5\%$; $Z_{\text{crítico}} = 1,96$. O Z_{obtido} foi de 0,7.

Sendo $Z_{\text{crítico}} > Z_{\text{obtido}}$, a diferença entre a proporção de pacientes com *Trichomonas* sp que possuíam cultura positiva e cultura negativa para micoplasmas, não é significativa.

As colorações de Gram e Giemsa, para o rastreamento da presença de micoplasmas nas amostras clínicas, permitiram apenas sugerir uma provável presença dos mesmos.

TABELA VIII
Relação entre a presença de micoplasmas e a
incidência de *Trichomonas* sp

Trichomonas micoplasmas	Presente	Ausente	Total
POSITIVO	11(20,8%)	42(79,2%)	53
NEGATIVO	3(14,3%)	18(85,7%)	21
TOTAL	14(18,9%)	60(81,1%)	74

4 - DISCUSSÃO

O isolamento e a identificação de *Mycoplasma hominis* e de *Ureaplasma urealyticum* em material de gestantes, tem a sua significância calcada nas alterações clínicas do trato geniturinário, de acordo com os vários trabalhos da literatura internacional^{28,73,74,90}.

No Brasil, são poucas as referências sobre o estudo do significado clínico da presença dos micoplasmas genitais, bem como sobre as técnicas de cultivo e identificação dos mesmos.

A importância da colonização por esses microrganismos e as subsequentes alterações clínicas causadas nas gestantes, reside no provável comprometimento fetal tantas vezes ressaltado e questionado^{7,29,106,121}.

O material clínico utilizado foi colhido na região cervical denominada fundo de saco de Douglas. Este sítio, de acordo com as observações feitas por REHEWY¹⁰⁴, em razão de possuir um pH mais elevado que o pH do fluxo vaginal, facilita a instalação de micoplasmas, os quais se desenvolvem melhor em pH próximo da neutralidade.

No que se refere às condições de transporte

e coleta da amostra clínica, estas visaram minimizar os ris
cos de contaminação e de perda de viabilidade dos micoplasmas
mas.

Para a coleta foi utilizado "swab" alginata
do neutro, o qual é atóxico para micoplasmas e cuja utiliza
ção é recomendada por CLYDE & MC CORMACK²⁰ em seus estudos
sobre coleta e transporte de amostras clínicas para pesquis
a de micoplasmas. O "swab" de algodão, utilizado por MAGAL
HÃES^{82,83} em seus estudos sobre micoplasmas, pode conter
ácidos graxos em sua composição, os quais inibem algumas esp
écies de microrganismos entre os quais os micoplasmas.

Uma vez que a amostra clínica não pode ser sem
eada imediatamente após a coleta, o transporte foi feito
no meio MLTr, utilizando-se um banho de gelo com a finalid
dade de manter a viabilidade dos micoplasmas, conforme o precon
izado por CLYDE & MC CORMACK²⁰.

O exame bacterioscópico do material clínico
obtido com auxílio de "swab" foi realizado utilizando-se as
colorações de Gram e Giemsa. Apesar da dificuldade na obs
servação dos micoplasmas na superfície das células epiteliais
das amostras, estes podem ser melhor evidenciados pela
coloração de Giemsa, conforme salientado por RAZIN¹⁰⁰.

Para se conseguir resultados satisfatórios no
isolamento desses microrganismos, a etapa do estudo da padr
onização dos meios de transporte, crescimento e identifica
ção tornou-se imprescindível e relevantes pelas dificuld
dades tanto na obtenção de determinados componentes dos meios

não encontrados no mercado interno, como também no processo de elaboração dos mesmos. Inúmeras tentativas de isolamento dos micoplasmas foram efetuadas com insucesso durante o presente trabalho, até chegar-se às modificações finais como as aqui apresentadas no capítulo de material e métodos

Dentre as modificações introduzidas no meio líquido de transporte MLTr, a substituição de albumina bovina 30% pela fração de soro PPLO, teve como objetivos torná-lo mais acessível, uma vez que a albumina bovina onera sua elaboração, além de facilitar tecnicamente seu preparo, visto que a filtração de albumina, através de membranas Milipore 0,2 μ m, na referida concentração é bastante difícil.

A introdução de anfotericina B na concentração de 2,5 μ g/mL, está concordante com o trabalho de ROTTEM¹⁰⁷, e foi feita com a finalidade de dificultar a proliferação de leveduras nesse meio (MLTr). Esta possui a capacidade de ligar-se a esteróis da membrana celular dos fungos aumentando-lhes a permeabilidade celular com perda de alguns de seus componentes intracelulares essenciais. Apesar da anfotericina B possuir uma maior afinidade pelo (esterol fúngico), pode também ligar-se ao colesterol da membrana dos micoplasmas, impedindo assim seu crescimento. Por essa razão, concentrações maiores que 2,5 μ g/mL, como as preconizadas nos trabalhos de MATTHEWS⁸⁶, MC CORMACK⁸⁷ e ainda pelo Laboratory Diagnosis Of Mycoplasma Infections¹³¹, não são recomendadas.

A penicilina G potássica foi adicionada ao meio de transporte, originalmente descrito por SHEPARD¹¹⁴,

com a finalidade de servir como impediente aos microrganismos da flora contaminante, a ela sensíveis.

No meio líquido MLU, utilizado para o crescimento de *Ureaplasma urealyticum*, a substituição do componente de enriquecimento CVA (Gibco Diagnostics Madison, USA), da forma original descrita por SHEPARD, pelo VX (Bacto Supplement VX, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA), foi feita dada a facilidade de aquisição deste último, além de que há hoje para comercialização o suplemento VX de procedência nacional (Suplemento VX LB, Laborclin, Paraná).

No meio MLA, para cultivo de micoplasmas genitais que hidrolizam a arginina, suprimiu-se a polimixina, a anfotericina B e a eritromicina do meio preconizado pelo Laboratory Diagnosis of Mycoplasma¹³¹, a fim de garantir o bom crescimento dos micoplasmas em questão, uma vez que tais substâncias, por seus efeitos impedientes sobre vários microrganismos, poderiam também inibí-los parcialmente. A supressão das substâncias em questão, foi sustentada pela formulação do meio de HAYFLICK⁵⁹, meio básico para cultivo de micoplasmas clássicos, da qual tais impedientes não fazem parte.

No que se refere ao meio sólido utilizado para a determinação da atividade da fosfatase, o emprego do p-nitrofenilfosfato como substrato alternativo, em substituição à fenoftaleína difosfato de sódio, substrato de eleição preconizado por BERGEY¹⁰² e por ALLUOTO², foi devido a impossibilidade da obtenção do mesmo. A hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela fosfatase dá origem, em meio alcalino,

ao p-nitrofenol, composto que apresenta cor amarela. Da mesma maneira como é realizada a determinação da fosfatase sérica, adicionou-se, após o período de incubação, hidróxido de sódio 0,02N com a finalidade de parar a reação e alcalinizar o meio, ressaltando com isso a cor do p-nitrofenol⁹¹.

O meio sólido utilizado para a detecção do fenômeno da formação de filmes e "spots", foi preparado suprimindo-se do meio original os seguintes componentes: a solução de DNA a 0,02%, o acetato de tálio e a penicilina G potássica. A supressão do DNA não acarretou prejuízos no desenvolvimento normal dos micoplasmas, o que foi constatado através do uso de controle positivo nas mesmas condições da semeadura e incubação.

Quanto ao emprego do acetato de tálio e da penicilina, usualmente utilizados como impeditores da flora contaminante, não se fez necessário uma vez que os micoplasmas testados encontravam-se puros. O efeito inibitório produzido pelo acetato de tálio sobre as cepas de *Ureaplasma urealyticum*, foi também uma das razões da sua não utilização¹³¹.

Na classificação dos microrganismos isolados como membros pertencentes à família *Mycoplasmataceae*, a necessidade de colesterol é vista como um dos critérios mais importantes¹⁰³. Para tanto, a prova de sensibilidade à digitonina 1,5%, realizada de acordo com a técnica descrita por FREUNDT⁴⁶, permitiu considerar todos os microrganismos testados como nutricionalmente exigentes desse componente, uma vez que os diâmetros de inibição obtidos por nossos

isolados foram iguais ou superiores a 5mm.

Caracterização dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*

A caracterização dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* foi baseada na morfologia colonial característica no meio MSM, no comportamento bioquímico que possibilitou a identificação da espécie *Ureaplasma urealyticum*, e na identificação sorológica com soro imune específico através dos testes de inibição metabólica e imunodifusão dupla, os quais permitiram a identificação de *Mycoplasma hominis*.

Ureaplasma urealyticum pode ser identificado bioquimicamente por possuir a capacidade de hidrolizar a uréia através da enzima urease, com produção de amônia, característica única entre os *Mollicutes*¹¹⁶.

Esta atividade foi detectada de acordo com a metodologia descrita por RAZIN¹⁰¹, através da observação de colônias diminutas marrom dourado, cuja coloração é decorrente da produção de MnO_2 em presença de amônia. Não foi possível realizar a identificação sorológica para diferenciar os diferentes sorotipos, mas a própria literatura registra alguns trabalhos como os de DISCHE²⁸; FOY⁴⁰; BIDET⁵; TARAFI¹²⁴ e MAGALHÃES⁸², os quais identificaram o *Ureaplasma urealyticum* baseados na morfologia colonial e na atividade da urease.

Quanto às condições de incubação em diversas etapas de semeadura e de identificação do microrganismo, v

rios autores preconizaram a anaerobiose à 37°C como sendo a ideal^{39,83,84}. Todavia, observando-se os efeitos das incubações à 37°C, em aerobiose, microaerofilia (jarra com vela), e anaerobiose, sobre o crescimento, constatou-se no presente estudo que tanto a microaerofilia quanto a anaerobiose propiciavam o mesmo resultado. Desta forma, optou-se pela microaerofilia, uma vez que para obter-se condições de anaerobiose seria necessário o emprego do sistema GasPack (BBL), o qual é bastante oneroso.

Todos os isolados foram submetidos a prova da urease, mas os resultados foram positivos somente para os identificados como *Ureaplasma urealyticum*, demonstrando a fidelidade da mesma.

A diferenciação presuntiva entre as espécies do gênero *Mycoplasma* foi realizada com o auxílio de algumas provas bioquímicas, uma vez que todas elas apresentam morfologia colonial semelhante¹⁰².

Como integrante do grupo de micoplasmas cujo crescimento é estimulado pela arginina, o *Mycoplasma hominis* apresenta como provável mecanismo para a degradação deste aminoácido, a via arginina deidrolase. Além do *Mycoplasma hominis* podem ser citados como pertencentes a este grupo o *Mycoplasma buccale*, o *Mycoplasma fermentans*, o *Mycoplasma orale* e o *Mycoplasma salivarium* que, embora muito raramente, podem eventualmente ser encontrados no trato geniturinário.

A distinção das espécies *M. hominis* e *M. orale*.

foi bioquimicamente impossível, uma vez que ambos são negativos às provas de metabolismo da glicose, à atividade da fosfatase, à formação de filmes e "spots" e à redução do te

As provas de inibição metabólica e de imuno difusão dupla possibilitaram a identificação final do *Mycoplasma hominis*. As duas provas foram concordantes, muito embora, quando da realização da inibição metabólica encontrou-se certa dificuldade na visualização da mudança da cor do meio de corrente da alteração do pH. As maiores dificuldades residiram portanto na faixa de variação do pH do indicador (vermelho de fenol), de 6,8 para 7.6-7,8, e na utilização da microtécnica a qual não fornecia bons contrastes entre a cor original do meio e a cor da reação positiva.

Caracterizados os micoplasmas obtidos do cultivo das amostras clínicas, estudou-se a prevalência desses microrganismos no grupo de risco e no grupo de controle.

A proporção de micoplasmas isolados no presente estudo foi de 94,6% no grupo de risco e de 81,2% no grupo de controle. As proporções de *Ureaplasma urealyticum* e de *Mycoplasma hominis* isoladas no total de gestantes estudado foram de 69,0% e 19,0%, respectivamente (Tabela II). Tais resultados foram concordantes quando comparados com os de HARRISON⁵⁶, realizado em Tucson nos Estados Unidos, e de MAJORI⁸⁴, realizado em Trieste, Itália, pois demonstraram a eficiência da metodologia utilizada, uma vez que os referidos autores, trabalhando com grupos e amostras clínicas se

melhantes, obtiveram: 72,3% de isolamento de *Ureaplasma urealyticum* e 23,5% de *Mycoplasma hominis*, e 76,7% de *Ureaplasma urealyticum* e 11,7% de *Mycoplasma hominis*, respectivamente.

No presente trabalho, do grupo de risco foi isolado *Ureaplasma urealyticum* de 21 pacientes (56,8%), *Mycoplasma hominis* de dois (5,4%) e ambos foram encontrados simultaneamente em seis pacientes (16,2%).

No grupo controle, *Ureaplasma urealyticum* foi encontrado em 18 pacientes (48,6%), *Mycoplasma hominis* isoladamente não foi encontrado em nenhuma (0,0%), enquanto que a presença simultânea de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* foi observada em seis casos (16,2%) (Tabela II). Foi ainda verificada uma taxa de 29,7% de gestações terminadas anormalmente no grupo de risco, enquanto que no grupo controle nenhum caso semelhante foi observado.

Esses resultados diferem daqueles encontrados por KUNDSIN e DRISCOLL⁷³ que, utilizando o mesmo tipo de material clínico (material cervical), e meios de cultivo análogos aos utilizados no presente estudo (meio básico de HAYFLICK⁵⁹ para micoplasmas clássicos e meio de SHEPARD¹¹³ para cepa T), encontraram 67% de positividade para micoplasmas no grupo de risco e 48% no grupo controle. Desse total, *Ureaplasma urealyticum* (cepa T) foi isolado em 42,5% dos casos, *Mycoplasma hominis* em somente 1,8% dos casos e o encontro simultâneo de ambos foi verificado em 22% das pacientes do grupo de risco. No grupo controle, os resultados foram: em 28,0% das pacientes foi isolado *Ureaplasma urealyticum*, enquanto que *Mycoplasma hominis* foi encontrado em 6,0% e am

bos foram isolados simultaneamente em 14,0%. Além disso os autores verificaram que 42,0% das gestações do grupo de risco e 23,0% daquelas do grupo controle terminaram anormalmente. Diante desses resultados, sugeriram um provável envolvimento dos micoplasmas como patógenos nos casos de gestações anormais.

No presente trabalho, contudo, não foi possível inferir nada a respeito da patogenicidade desses microrganismos, uma vez que as taxas de incidência nos grupos de risco e controle não foram estatisticamente significantes.

Apesar de não serem significativas as diferenças na prevalência entre os dois grupos, foi possível observar que, entre as 37 pacientes do grupo de risco (Tabela III), 15 possuíam alterações definidas clinicamente e que justificavam as anomalias gestacionais; dessas, sete tiveram gestações terminadas anormalmente, sendo cinco com culturas positivas para micoplasmas. Dentre as oito restantes, cujo produto conceptual foi normal, cinco tiveram cultura positiva para micoplasmas. Das outras 22 gestantes do grupo de risco, as quais não possuíam qualquer indício clínico que justificasse os insucessos gestacionais, quatro tiveram suas gestações terminadas de modo anormal, tendo todas cultura positiva. Dentre as 18 restantes deste grupo, cujos produtos conceptuais foram normais, 15 eram positivas para micoplasmas. Esses achados sugerem a necessidade de estudos posteriores sobre a problemática enfocada, para que se possa chegar a um resultado mais consistente e conclusivo.

Um outro dado também controvertido e aqui em focado foi quanto à possível relação existente entre as presenças de *Ureaplasma urealyticum* e a de *Trichomonas* sp. REHEWEY¹⁰⁴, estudando a presença de *Ureaplasma urealyticum* no fluido vaginal e no muco cervical, verificou que de ambos os materiais clínicos não se isolava *Ureaplasma urealyticum* quando *Trichomonas* sp estava presente. Ele concluiu que provavelmente alguns dos subprodutos produzidos pelos trichomonas tornavam desfavorável a instalação de ureaplasmas. GIACOMINI⁵² contudo, ao contrário de REHEWEY, encontrou uma associação entre a presença de tricomonas e o isolamento de *Ureaplasma urealyticum*, justificando assim o caráter oportunista dos micoplasmas. Este autor constatou que normalmente em gestantes já havia um decréscimo na incidência de tricomonas, em decorrência provavelmente das alterações de mucosa observadas durante a gestação.

No presente estudo, o *Ureaplasma urealyticum* foi encontrado independentemente da presença ou não de trichomonas, e a inexistência de associação entre os dois agentes foi confirmada estatisticamente conforme dados expostos no capítulo Resultados.

O presente trabalho, realizado em condições que nosso meio permitiu, revelou ser possível o isolamento e a identificação de micoplasmas através da metodologia aqui descrita, acessível ao laboratório de rotina diagnóstica.

Quanto à interpretação clínica da presença de micoplasmas e as alterações gestacionais nada pode ser estabelecido, uma vez que a própria controvérsia existente

na literatura internacional, demonstra a grande dificuldade em se atribuir um papel patogênico para esses microrganismos sobretudo nas alterações materno-fetais.

Se as pesquisas fossem voltadas para a sorotipagem das cepas isoladas de *Ureaplasma urealyticum* e de *Mycoplasma hominis* poderiam talvez elucidar alguns aspectos ainda obscuros. LIN⁸⁰, nos Estados Unidos da América, em seus estudos sorológicos sobre micoplasmas genitais humanos, verificou a presença de mais de um sorotipo de *Ureaplasma urealyticum* em uma única amostra clínica. KAPUR⁶⁶, desenvolvendo na Índia um trabalho de isolamento de T-mycoplasmas de secreção uretral, também pressupôs, devido às variações entre sintomatologia clínica e o isolamento de micoplasmas, haver cepas de T-mycoplasmas com diferentes graus de virulência. E finalmente, QUINN, com seus estudos realizados em Toronto no Canadá, sobre evidência sorológica do *Ureaplasma urealyticum* nas infecções em mulheres com histórico de aborto espontâneo⁹⁸, observou que, de acordo com seus resultados, certos sorotipos de *Ureaplasma urealyticum* poderiam ser mais patogênicos do que outros.

Em vista do fato de que no nosso meio poucos investigadores dedicam-se ao estudo dos micoplasmas, é intenção nossa prosseguir as pesquisas deste microrganismo, abordando melhor os aspectos antigênicos e imunogênicos, contribuindo para a determinação de sorotipos, com o intuito de fornecer subsídios ao diagnóstico dessa infecção, além da verificação do estado de imunidade das gestantes.

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

Alicerçado em trabalhos contidos na literatura internacional sobre a implicação dos micoplasmas nas alterações do trato geniturinário e sobretudo nas chamadas "falhas da reprodução", o presente estudo teve como objetivo, além da introdução de uma tecnologia de pesquisa desses microrganismos acessível ao laboratório clínico de rotina diagnóstica, também determinar as taxas de colonização de *Mycoplasma hominis* e de *Ureaplasma urealyticum* em gestantes pertencentes a uma classe de baixo nível sócio-econômico.

Estas gestantes, em número de 74 (setenta e quatro), foram divididas em dois grupos: um grupo de 37 (trinta e sete) gestantes que possuía histórico anterior de alterações perigestacionais como: abortos, natimortos, prematuros, etc., e que constituíram o Grupo de Risco; e o outro constituído de 37 (trinta e sete) gestantes com gestações anteriores normais, Grupo Controle.

Utilizando-se os materiais e métodos adaptados às condições de nosso meio, foram encontrados os seguintes resultados: a proporção de micoplasmas isolada foi de 94,6% no grupo de risco e de 81,2% no grupo controle. Do

grupo de risco, *Ureaplasma urealyticum* foi isolado de vinte e um pacientes (56,8%), *Mycoplasma hominis* de dois (5,4%) e ambos foram encontrados em seis pacientes (16,2%). No grupo controle, *Ureaplasma urealyticum* foi encontrado em 18 pacientes (48,6%), *Mycoplasma hominis* não foi isolado de nenhuma (0,0%), enquanto que a associação *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* foi observado em seis casos (16,2%). Foi ainda verificado que onze (30,5%) gestações terminaram anormalmente no grupo de risco, sendo quatro (11,1%) de pacientes que não possuíam quaisquer alterações clínicas que as justificassem. No grupo controle, nenhuma alteração foi verificada entre os casos notificados.

A análise estatística, dos resultados, permitiu verificar que não houve diferenças significantes entre os grupos estudados.

CONCLUSÕES

- As modificações introduzidas nos meios de cultivo empregados no transporte, isolamento e manutenção das cepas, forneceram resultados satisfatórios.
- A metodologia utilizada possibilitou a identificação dos micoplasmas, sobretudo do *Mycoplasma hominis*, cuja caracterização final foi realizada através de técnicas sorológicas.

- A proporção de isolamento de micoplasmas no total de gestantes estudados foi de 87,8%, sendo 68,9% de *Ureaplasma urealyticum* e 18,9% de *Mycoplasma hominis*, proporções estas comparáveis com as encontradas na literatura internacional.
- As taxas de isolamento de *Ureaplasma urealyticum* e de *Mycoplasmas hominis* no grupo de risco foram de 73,0% e 21,6%, respectivamente. No grupo controle as taxas obtidas foram de 65,0% de *Ureaplasma urealyticum* e de 16,2% de *Mycoplasma hominis*. Apesar da proporção de positivos ser mais baixa no grupo controle do que no grupo de risco, as diferenças não foram estatisticamente significantes.
- Não se constatou associação entre a presença de *Trichomonas* sp e de *Ureaplasma urealyticum* no trato genital de gestantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALTOMARE, G.F.; POLENGHI, M.M.; PIGATTO, P.D.; BELLA, G.; VIVANTI, R.; ITALIANO, P. — The role of mycoplasmas in sexually transmitted vaginitis. Boll. Ist. Sieroter. Milan., Milan, 63(4):348-51, 1984.
2. ALUOTTO, B.B.; WITTLER, R.G.; WILLIAMS, C.O.; FABER, J.E. — Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 20:35-58, 1970.
3. BARILE, M.F.; SCHIMKE, R.T.; RIGGS, D.B.— Presence of the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma*. J. Bacteriol., Baltimore, 91(1):189-92, 1966.
4. BENNETT, A.H.; KUNDSIN; R.B.; SHAPIRO, S.R. — T-strain mycoplasmas, the etiologic agent of non-specific urethritis: a venereal disease. J. Urol., Baltimore,

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas e local de publicação dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1984.

109:427-9, 1973.

5. BIDET, F. & MINCK, R. — Recherche de mycoplasmes T chez les accouchées. Nouv. Presse Med., Paris, 7 (10):851, 1978.
6. BØE, O.; IVERSEN, O.E.; MEHL, A. — Septicemia due to *Mycoplasma hominis*. Scand. J. Infect. Dis., Stockholm, 15(1):87-90, 1983.
7. BONISSOL, C.; BOUSQUET, C.; DURIUX, M.F. — Contribution a l'étude des souches T de Mycoplasmes dans les infections vaginales et uretrales. Pathol. Biol., Paris, 20:909-18, 1972.
8. BORDET, J. — La morphologie du microbe de la péricapnemonie des bovidés. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 24:161-7, 1910.
9. BORREL; DUJARDIN-BEAUMETZ; JEANTET; JOUAN. — Le microbe de la péricapnemonie. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 24: 168-79, 1910.
10. BOWIE, W.R. — Etiology of nongonococcal urethritis, evidence for *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*. J. Clin. Invest., New York, 59:735-42, 1977.
11. BREDT, W.; FELDNER, J.; KAHANE, I. — Adherence of mycoplasmas to cells and inert surfaces: phenomena, experimental models and possible mechanisms. Isr.

J. Med. Sci., Jérusalém, 17:586-8, 1981.

12. BRIDÉ, J. & DONATIEN, A. — Le microbe de l'agalaxie contagieuse du mouton et de la chèvre. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 39:925-51, 1925.
13. BRUNNER, H.; WEIDNER, W.; Schiefer, H.G. — Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in prostatitis. J. Infect. Dis., Chicago, v.147(5):807-13, 1983.
14. BUSOLO, F.; Zanchetta, R. — Do mycoplasmas inhibit the human sperm fertilizing ability in vitro? Isr. J. Med. Sci., Jérusalém, 20:902-4, 1984.
15. CASPI, E.; SOLOMON, F.; SOMPOLINSKY, D.B.V.M. — Early abortion and *Mycoplasma* infection. Isr. J. Med. Sci., Jérusalém, 8:122-7, 1972.
16. CHANOCK, R.M.; DIENES, L.; EATON, M.D.; EDWARD, D.G.; FREUNDT, 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, 140:662, 1963.
17. CHANOCK, R.M.; HAYFLICK, L.; BARILENE, M.F. — Growth on artificial medium of an agent associated with

atypical pneumonia and its identification as a PPLO.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, 48:41-9, 1962.

18. CHRISTENSEN, K.K.; HÄGERSTRAND, I.; MARDH, P. -- Late spontaneous abortion associated with *Mycoplasma hominis* Infection of the fetus. Scand. J. Infect. Dis., Stockholm, 14(1):73-4, 1982.

19. CLYDE, W.A. Mycoplasma-animal host interrelationships. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., eds. Methods in mycoplasmaology. New York, Academic Press, 1983. v.1, p.15-9.

20. CLYDE, W.A. & McCORMACK, W.M. -- Collection and transport of specimens. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., eds. Methods in mycoplasmaology. New York, Academic Press, 1983. v.1, p.103-7.

21. COSTA NETO, P.L.O. -- Estatística. São Paulo, Edgard Blücher, 1977. p.118-9.

22. DARLAND, G.; BROCK, T.D.; SAMSONOFF, W.; CONTI, S.F. A thermophilic, acidophilic, mycoplasma isolated from a coal refuse pile. Science, Washington, 170: 1416-8, 1970.

23. DIENES, L. -- Cultivation of pleuropneumonia-like organisms from female genital organs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 44:468-9, 1940.

24. DIENES, L. - Further Observations on the L-organism of Klieneberger. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 39:365-7, 1938.
25. DIENES, L. & EDSALL, G. - Observations on the L-organism of Klieneberger. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 36:740-4, 1937.
26. DIENES, L. & SULLIVAN, E.R. - Morphology and Nature of Pleuropneumonia-Like Microorganisms. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 41:424-6, 1939.
27. DIMUSTO, J.C.; BOHJALIAN, O.; MILLAR, M. - *Mycoplasma hominis* type I infection and pregnancy. Obst. Gynecol., Amsterdam, 41:33-7, 1973.
28. DISCHE, M.R.; QUINN, P.A.; CZEGLÉDY-NAGY, E.; STURCESS, J.M. - Genital mycoplasma infection intrauterine infection: pathologic study of the fetus and placenta. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 72:167-74, 1979.
29. DRISCOLL, S.G.; KUNDSIN, R.B.; HORNE, H.W.; SCOTT, J. M. - Infections and first trimester losses: possible role of mycoplasmas. Fertil. Steril., Birmingham, 20:1017-9, 1969.
30. EDWARD, D.G. ff. - Determination of sterol requirement for mycoplasmatales. J. Gen. Microbiol., Colchester,

69:205-10, 1971.

31. EDWARD, D.G.ff. -- An investigation of the biological properties of organisms of The pleuropneumonia group, with suggestions regarding the identification of strains. J. Gen. Microbiol., Colchester, 4:311-29, 1950.
32. EDWARD, D.G.ff. - A Suggested classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., Ames, 5(2): 85-93, 1955.
33. EDWARD, D.G.ff. - The pleuropneumonia group of organisms: a review, together with some new observations. J. Gen. Microbiol., Colchester, 10:27-64, 1954.
34. EDWARD, D.G.ff. & FREUNDT, E.A. - Amended nomenclature for strains related to *Mycoplasma laidlawii*. J. Gen. Microbiol., Colchester, 62:1-2, 1970.
35. EDWARD, D.G.ff. & FREUNDT, E.A. - The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. J. Gen. Microbiol., Colchester, 14:197-207, 1956.
36. EDWARD, D.G.ff. & FREUNDT, E.A. - Proposal for *Mollicutes* as name of the class established for the order

Mycoplasmatales. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 17(3):267-8, 1967.

37. EMBREE, J.E.; KRAUSER, V.W.; EMBIL, J.A.; MACDONALD, S. - Placental infection with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*: clinical correlation. Obstet. Gynecol., New York, 56(4):475-81, 1980.

38. FOSTER, J.P. — Some historical notes on contagious Pleuro-Pneumonia. J. Am. Vet. Med. Assoc., Chicago, 1:918-22, 1934.

39. FOY, H.; KENNY, G.E.; LEVINSOHN, E.M.; GRAYSTON, J.T. Acquisition of mycoplasmata and T- Strains during infancy. J. Infect. Dis., Chicago, 121(6):579-86, 1970.

40. FOY, H.; KENNY, G.; BOR, E.; HAMMAR, S.; HICKMAN, R.- Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* (T Strains) in urine of adolescents. J. Clin. Microbiol., Washington, 2(3):226-30, 1975-

41. FOWLKES, D.M.; DOOHER, G.B.; OLEARY, W.M. — Evidence by scanning electron microscopy for an association between spermatozoa and T- mycoplasmas in men of infertile marriage. Fertil. Steril., Birmingham, 26(12):1203-11, 1975.

42. FREUNDT, E.A. — The classification of the pleuropneu-

- monia group of organisms (*Borrelomycetales*). Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 5(2):67-76, 1955.
43. FREUNDT, E.A. - Culture Media for Classic Mycoplasmas
In:RAZIN, S. & TULLY, J.G., eds. Methods in mycoplasmaology. New York, Academic Press, 1983. v.1, p. 128.
 44. FREUNDT, E.A. - Film and spot production. In:RAZIN, S. & TULLY, J.G., eds. Methods in mycoplasmaology. New York, Academic Press, 1983. v.1, p.373-4.
 45. FREUNDT, E.A. - *Mycoplasma hominis*: historical outline and taxonomy. Sex. Trans. Dis., Philadelphia, 10 (4 supl.):226-9, 1983.
 46. FREUNDT, E.A.; ANDREWS, B.E.; ERNO, H.; KUNZE, M.; BLACK, F.T. - The Sensitivity of Mycoplasmatales to Studium -Polynethol-Sulfonate and Digitonin. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt.1 Orig.A. 222:104-12, 1973.
 47. FREUNDT, E.A. & EDWARD, D.G.ff. - Classification and Taxonomy. In:BARILE, M.F. & RAZIN, S., eds. The mycoplasmas. New york, Academic Press, 1979. v.1, p. 24.
 48. FREUNDT, E.A. & EDWARD, D.G.ff. — Proposal for establishing a new genus (*Acholeplasma*) and family

(*Acholeplasmataceae*) of the order *Mycoplasmatales*.
Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 21:151-3, 1971.

49. FRIBERG, J. — Mycoplasmas and ureaplasmas in infertility and abortion. Fertil. Steril., Birmingham, 33(4): 351-9, 1980.

50. FRIBERG, J. & GNARPE, H. — Mycoplasma and human reproductive failure III. Pregnancies in "infertile" couples. Am. J. Obstet. Gynecol., St. Louis, 1:23-6, 1973.

51. GELMANN, A.C. & DERS HEWITZ, D. — Skene's gland infection. J. Urol., Baltimore, 135:786-8, 1986.

52. GIACOMINI, T.; DUMOUCHEL, P.; LOCKNER, M.; BARDIAUX, M. — Recherche Systématique d'*Ureaplasma urealyticum* au cours des prélèvements vaginaux. Résultats. J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod., Paris, 9:439-43, 1980.

53. GNARPE, H. & FRIBERG, J. — Mycoplasma and human reproductive failure. I. The occurrence of different mycoplasmas in couples with reproductive failure. Am. J. Obstet. Gynecol., St. Louis, 15:727-31, 1972.

54. GNARPE, H. & FRIBERG, J. — T-Mycoplasmas on Spermatozoa and infertility. Nature., London, 245(5420):97-8, 1973.

55. GRANT, C.L. & PRAMER, D. — Minor element composition of yeast extract. J. Bacteriol., Baltimore, 84:869-70, 1962.

56. HARRISON, H.R.; ALEXANDER, E.R.; WEINSTEIN, L.; LEWIS, M.; NASH, M.; SIM, D.A.— Cervical *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmal infections in pregnancy. JAMA J. Am. Med. Assoc., Chicago, 250(13):1721-7, 1983.

57. HARWICK, H.J.; PURCELL, R.H.; IUPPA, J.B.; FEKETTY, F. R. — *Mycoplasma hominis* and abortion. J. Infect. Dis., Chicago, 121:260-8, 1960.

58. HARWICK, H.J.; PURCELL, R.H.; IUPPA, J.B.; FEKETTY, F. R. — *Mycoplasma hominis* and postpartum febrile complications. Obstet. Gynecol., New York, 37:765-8, 1971.

59. HAYFLICK, L. & CHANOCK, R.— Mycoplasmas species of man. Bacteriol. Rev., 29(2):185-221, 1965.

60. International Committee on Bacteriological Nomenclature. The status and synonymy of the bacterial generic name ASTEROCOCCUS. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Tax. Ames, 5(1):13-20, 1955.

61. International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes. Proposal of minimal standards for descriptions of new species of the class Mollicutes. Int. J. Syst.

Bacteriol., Washington, 29:172-80, 1979.

62. International Committee on Systematic Bacteriology.
Subcommittee on the Taxonomy of *Mycoplasmatales*.
Proposal for minimal standards for descriptions of
new species of the order *Mycoplasmatales*. Int. J.
Syst. Bacteriol., Washington, 22(3):184-8, 1972.
63. JONES, D.M. - *Mycoplasma hominis* in abortion. Br. Med.
J., London, 1:338-40, 1967.
64. JONES, D.M. - *Mycoplasma hominis* in pregnancy. J.
Clin. Pathol., London, 20:633-5, 1967.
65. KAHANE, I. - In vitro studies on the mechanism of adherence
and pathogenicity of mycoplasmas. - Isr. J. Med.
Sci., Jerusalem, 20:874-7, 1984.
66. KAPUR, T.R.; SINGH, O.P.; GUPTA, U.; HINGORANI, V. ;
KANDHARI, K.C.; BHUTANI, L.K. -- Isolation of T-my
coplasma (*Ureaplasma urealyticum*) from the genito-
-urinary tract. J. Indian Med. Assoc., Calcutta,
70(5):101-3, 1978.
67. KLIENEBERGER, E. - The colonial development of the or-
ganisms of Pleuropneumonia and agalactia on serum
agar and variations of the morphology under dif-
ferent conditions of growth. J. Pathol. Bacteriol.,
Edinburgh, 39:409-20, 1934.

68. KLIENEGER-NOBEL, E.- Mycoplasma, A Brief Historical Review. Ann. N. Y. Acad. Sci., New York, 143:713-8, 1967.
69. KLIENEGER, E. — The natural occurrence of Pleuro pneumonia Like Organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 40:93-105, 1935.
70. KOSSMAN; J.C.; FLORET, D.; RENAULD H.; SEPETJIAN, M.; MONNET, P. — Syndrome de fiessinger leroy reiter chez L'effant et *Ureaplasma urealyticum* (Mycoplasma Tiny). Pédiatrie., Lyon, 35(3):237-42, 1980.
71. KUNDSIN, R.B.; AMPOLA, M.; STREETER; S.; NAURATH, P.- Chromosomal aberrations induced by T strain Mycoplasmas. J. Med. Genet., London, 8:181-7, 1971.
72. KUNDSIN, R.B.; DRISCOLL, S.G.; MONSON, R.R.; YEH, C.; BIANO, S.A.; COCHRAN, W.D. — Association of *Ureaplasma urealyticum* in the placenta with perinatal morbidity and mortality. N. Engl. J. Med., Boston, 310:941-5, 1984.
73. KUNDSIN, R.B. & DRISCOLL, S.G. — Mycoplasma and human reproductive failure. Surg. Gynecol. Obstet., Chicago, 131:89-92, 1970.
74. KUNDSIN; R.B.; DRISCOLL, S.G.; MING, P.M.L. — Strain

- of Mycoplasma associated with human reproductive failure. Science., Washington, 157:1573-4, 1967.
75. KUNDSIN, R.B.; DRISCOLL, S.G.; PELLETIER, P.A. — *Ureaplasma urealyticum* incriminated in perinatal morbidity and mortality. Science., Washington, 213 (4506):474-5, 1981.
76. LAIDLAW, P.P.; F.R.S.; ELFORD, W.J. — A New Group of Filterable Organisms. Proc. Roy. Soc., London B, 120: 292-303, 1936.
77. LAMEY, J.R.; ESCHENBACH, D.A.; MITCHELL, S.H.; BLUMHAGEN, J.M.; FOY, H.M.; KENNY, G.E. — Isolation of mycoplasmas and bacteria from the blood of postpartum women. Am. J. Obstet. Gynecol., St.Louis, 143:104-12, 1982.
78. LEDINGHAM, J.C.G. — The growth phases of pleuropneumonia and agalactia on liquid and solid media. J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 37:393-409, 1933
79. LEMCKE, R.M. — A serological comparison of various species of mycoplasma by an agar gel double diffusion technique. J. Gen. Microbiol., Colchester, 38:91-100, 1965.
80. LIN, C.S.L.; RADNAY, K.; KENDRICK, M.T.; POSNER, B.; KASS, E.H. Serologic studies of human genital mycoplasmas:

- distribution of titers of mycoplasmacidal antibody to *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. J. Infect. Dis., Chicago, 137(3): 266-72, 1978.
81. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; LEWIS, F.; RANDALL, R. J. — Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Baltimore, 193:265-75, 1951.
 82. MAGALHÃES, M.; ANDRADE, M.; VÉRAS, A. — Uretrites não gonocócicas masculinas associadas a *Chlamydia*, *Ureaplasma* e *Trichomonas*. Rev. Microbiol., São Paulo, 13(2):156-60, 1982.
 83. MAGALHÃES, M.; VÉRAS, A.; ANDRADE, M. — Comparação entre "swabs" uretrais e sedimentos urinários no isolamento de agentes causais de uretrites. Rev. Microbiol., São Paulo, 11(4):110-2, 1980
 84. MAJORI, L.; CAMPELLO, C.; MANDRUZZATO, G.P.; SPANIO, P. — L'epidemiologia delle micoplasmosi. Nota III. Micoplasmosi genitale in gravidanza e trasmissione neonatale. Boll. Ist. Sieroter Milan., 53(3): 515-24, 1974.
 85. MARTZINOVSKI, E.J. — De l'étiologie de la Péripneumonie. Ann. Inst. Pasteur., Paris, 25:914-7, 1911.
 86. MATTHEWS, C.D.; ELMSLIE, R.G.; CLAPP, K.H.; SVIGOS, J.M.

- The frequency of genital mycoplasma infection in human fertility. Fertil. Steril., Birmingham, 26 (10): 988-90, 1975.
87. MC COMARCK, W.M.; ROSNER, B.; LEE, Y.H. - Colonization with Genital Mycoplasma in women. Am.J.Epidemiol., Baltimore, 97(1):240-5, 1973.
88. MC COMARCK, W.M.; ROSNER, B.; ALPERT, S.; EVRARD, J.R.; CROCKETT, V.A.; ZINNER, S.H. - Vaginal colonization with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. Sex. Trans. Dis., Philadelphia, 13(2):67-70, 1986.
89. MC DONALD, M.I.; LAM, M.H.; BIRCH, D.F.; D'ARCY, A.F.; FAIRLEY, K.F.; PAVILLARD, E.R.J. — *Ureaplasma urealyticum* in patients with acute symptoms of urinary tract infection. J. Urol., Baltimore, 128:517-8, 1982.
90. MIETTINEN, A.; PAAVONEN, J.; JANSSEN, E.; LEINIKKI, P. - Enzyme immunoassay for serum antibody to *Mycoplasma hominis* in women with acute pelvic inflammatory disease. Sex. Trans. Dis., Philadelphia, 10:289-93, 1983.
91. MOURA, R.A.A.A.; PURCHIO, A.; ROSSI, A.L.R.; STRUFALDI, B.; NOGUEIRA, D.M.; HOXTER, G.; COUTINHO, J.P.; ALMEIDA, T.V. — Técnicas de laboratório. 2.ed. São

Paulo, Atheneu, 1982. p.230-3.

92. NOCARD & ROUX.- Le microbe de la péripneumonie. Ann. Inst. Pasteur., Paris, 12:240-62, 1898.
93. NOWAK, J. — Morphologie, nature et cycle evolutif du microbe de la péripneumonie des bovidé. Ann. Inst. Pasteur., Paris, 43:1330-52, 1929.
94. NOWAK, J. & LOMINSKI, I.- Morphologie et évolution du microbe de l'agalaxie contagieuse des ovins et des milieux nutritifs. Ann. Inst. Pasteur., Paris, 53: 438-51, 1934
95. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reation in gels. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B: Microbio., Copenhagen, 26:507-15, 1949.
96. PERREAU, P.; GAYT, P.; MONNIER, J. — Le méthode d'immunofluorescence et l'identification des Mycoplasmas. Application au diagnostic de la péripneumonia. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays. Trop., Paris, 22 (4):481-93, 1969.
97. PURCELL, R.H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; WONG, D.C.; CHANOCK, R.M. A color test for the measurement of antibody to the non-acid-forming human mycoplasma species. Am. J. Epidemiol., Baltimore, 84:51-66, 1966.

98. QUINN, P.A.; SHENCHUK, A.B.; SHUBER, J.; LIE, K.I.;
RYAN, E.; SHEU, M.; CHIPMAN, M.L. — Serologic
evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in
women with spontaneous pregnancy loss. Am. J. Obstet.
Gynecol., St.Louis, 145:245-9, 1983.

99. RAZIN, S. — Characteristics of the Mycoplasmas as a
group. In: RAZIN, S. & TULLY, J.G., eds. Methods in
mycoplasmaology. New York, Academic Press, 1983, v.1.
p.3

100. RAZIN, S. - Mycoplasmas: the smallest pathogenic procaryotes.
Isr. J. Med. Sci., Jerusalem, 17(7):510-5, 1981.

101. RAZIN, S. & CIRILLO, V.P. — Sugar fermentation. In:
RAZIN, S. & TULLY, J.G., eds. Methods in mycoplas-
mology. New York, Academic Press, 1983, v.1. p.337-
343.

102. RAZIN, S. & FREUNDT, E.A. — The mycoplasmas. In:
BERGEYS manual of systematic Bacteriology. Baltimo
re, Willians & Wilkins, 1984. v.1. p.740-93.

103. RAZIN, S. & TULLY, J.G. — Cholesterol requirement of
Mycoplasmas. J. Bacteriol., Baltimore, 102(2):306-
310, 1970.

104. REHEWY, M.S.E.; JASZCZAK, S.; HAFEZ, E.S.E.; THOMAS,
A.; BROWN, W.J. — *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma)

- in vaginal fluid and cervical mucus from fertile and infertile women. Fertil. Steril., Birmingham, 30:297-300, 1978.
105. ROBINSON, M.I.; ALLISON, J.M.; HARTMAN, F.A. - *Anaeroplasma abactoclasticum* gen. nov., sp. nov. an obligately anaerobic mycoplasma from the rumen. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 25(2):173-81, 1975.
106. ROMANO, N.; CAROLLO, F.; ROMANO, F. — Mycoplasmas in aborted and malformed fetuses. Riv. Ist. Sieroter. Ital., Naples, 43:217-24, 1968.
107. ROTTEM, S. - Differentiation of sterol - requiring from sterol-nonrequiring mycoplasmas by amphotericin B. Appl. Microbiol., Washington, 23(3):659-60, 1972.
108. SABIN, A.B. - The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group. Bacteriol. Rev., Washington, 5(1):1-66, 1941.
109. SAGLIO, P.; LHOSPITAL, M.; LAFLECHE, D.; DUPONT, G; BOVÉ, J.M.; TULLY, J.G.; FREUNDT, E.A. - *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: a Mycoplasma-Like Organism associated with "stubborn" disease of Citrus. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 23(3):191-204, 1973.
110. SCHEREFEL, A. — |*Asterococcus* n.g. superbui (Cienk.) Scherffel und dessen angebliche beziehungen zu

- eremosphaera. | Ber. Dtsch. Bot. Ges. A., Berlin, 22: 762, 1908 Apud HAYFLIC, L. et al. Bacteriol. Rev., 29(2):185-221, 1965.
111. SHEPARD, M.C. - Cultivation and properties of T-strains of mycoplasma associated with nongonococcal urethritis. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, 143:505-13, 1967.
112. SHEPARD, M.C. — The Recovery of Pleuropneumonia-Like Organisms from Negro Men with and without Nongonococcal Urethritis. Am. J. Syph. Gonorrhea Vener. Dis., St.Louis, 38:113-24, 1954.
113. SHEPARD, M.C. - Standard fluid medium 10 for cultivation and maintenance of *Ureaplasma urealyticum*. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 24:160-71, 1974.
114. SHEPARD, M.C. & LUNCEFORD, C.D. - Differential agar medium (A₇) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T Mycoplasma) in primary cultures of clinical material. J. Clin. Microbiol., Washington, 3(6): 613-25, 1976.
115. SHEPARD, M.C.; LUNCEFORD, C.D.; FORD, D.K.; PURCELL, R.H.; TAYLOR-ROBINSON, D.; RAZIN, S.; BLACK, F.T. *Ureaplasma urealyticum* gen. nov., sp. nov.: Proposed Nomenclature for the Human T(T-strain) Mycoplasmas. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 24(2):160-71, 1974.

116. SHEPARD, M.C. & LUCEFORD, C.D. - Urease color test Medium U-9 for the detection and identification of "T" mycoplasmas in clinical material. Appl. Microbiol., Washington, 20(4):539-43, 1970.
117. SHOETENSACK, M. - Pure cultivation of the filtrable virus isolated from canine distemper. Kitasato Arch. Exp. Med., Tokyo, 11:277-89, 1934.
118. SHURIN, P.A.; ALPERT, S.; ROSNER, B.; DRISCOLL, S.G.; LEE, Y.H.; MC CORMACK, W.M.; SANTAMARINA, B.A.G. ; KASS, E.H. — Chorioamnionitis and colonization fo the newborn infant with genital mycoplasmas. N. Engl. J. Med., Boston, 293:5-8, 1975
119. SKRIPAL, G.I. Revival of the Name *Spiroplasmataceae* fam. nov., nom.rev., omitted from the 1980 approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 33(2):408, 1983.
120. SOMPOLINSKY, D.; SOLOMON, F.; LEIBA, H.; CASPI, E.; LEWINSOHN, G.; ALMOG, C. — Puerperal sepsis due to T-strain *Mycoplasma*. Isr. J. Med. Sci., Jerusalém, 7:745-8, 1971.
121. STRAY-PEDERSEN, B.; ENG, J.; REIKVAM, M.T. — Uterine T-mycoplasma colonization in reproductive failure. Am. J. Obstet. Gynecol., St.Louis, 130:307-11, 1978.

122. STYLER, M. & SHAPIRO, S.S. - "Mollicutes (mycoplasma) in infertility". Fertil. Steril., Birmingham, 44 (1):1-12, 1985.
123. Subcommittee on the Taxonomy of Mycoplasmatales. Recommendation on nomenclature of the order mycoplasmatales. Science., Washington, 155:1694-6, 1967.
124. TAFARI, N.; ROSS, S.; NAEYE, R.L.; JUDGE, D.M.; MARBOE, C. - Mycoplasma T strains and perinatal death. Lancet, London, 17:108-9, 1986.
125. TANG, F.F. & WEI, H. - An investigation of the causal agent of Bovine Pleuropneumonia. J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 40:391-406, 1935.
126. TAYLOR-ROBINSON, D. & MC CORMACK, W.M. — The genital mycoplasmas. N. Engl. J. Med., Boston, 302:1063-7, 1980.
127. TAYLOR-ROBINSON, D.; CSONKA, G.W.; PRENTICE, M.J. — Human Intra-uretral Inoculation of *Ureaplasmas*. Q. J. Med., Oxford, 46:309-26, 1977
128. THOMSEN, A.C. — Occurrence of mycoplasmas in urinary tracts of patients with acute pyelonephritis. J. Clin. Microbiol., Washington, 8(1):84-8, 1978.
129. TULLY, J.G. & SMITH, L.G. - Postpartum septicemia with

Mycoplasma hominis. JAMA J. Am. Med. Assoc., Chicago, 204(9):169-70, 1968.

130. TURNER, A.W. - A study of the morphology and life cycles of the organism of Pleuropneumonia Contagiosa Boum (*Borrelomyces peripneumoniae* nov.gen.) J. Pathol. Bacteriol., Edinburgh, 41:1-32, 1930
131. VELLECA, W.M.; BIRD, B.R.; FORRESTER, F.T. - Arginine broth medium for growth of *M. hominis*. In: LABORATORY diagnosis of mycoplasma infections: U.S. Dep. of Health, Education, and Welfare, CDC., Atlanta, 1979. p.120.
132. VINTHER, O. - Biochemistry of *Mycoplasma hominis*. Sex. Trans. Dis., Philadelphia, 10(4suppl.):244-6, 1983.
133. WEIDNER, W.; BRUNNER, H.; KRAUSE, W. — Quantitative culture of *Ureaplasma urealyticum* in patients with chronic prostatitis or perstatosis. J. Urol., Baltimore, 124:622-5, 1980.
134. WROBLEWSKI, W. — Morphologie et cycle evolutif des microbes de la péripneumonie des bovides et de l'agalaxie contagieuse des chèvres et des moutons. Ann. Inst. Pasteur., Paris, 47:94-115, 1931.