

**BIBLIOTECA**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Universidade de São Paulo**

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

**Detecção de espécies incomuns de micoplasmas e  
do plasmídeo de resistência “*tetM*” em material  
cervical de gestantes por técnicas moleculares.**

**RENATA CRISTINA GODRY**

**Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE**

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

**São Paulo  
2001**

16. 956

RENATA CRISTINA GODRY

DETECÇÃO DE ESPÉCIES INCOMUNS DE MICOPLASMAS  
E DO PLASMÍDEO DE RESISTÊNCIA “*tetM*”  
EM MATERIAL CERVICAL DE GESTANTES  
POR TÉCNICAS MOLECULARES.

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha  
orientador/presidente

Rosângela Verlengia  
1º. examinador

Arthur Gruber  
2º. examinador

São Paulo, 20 de dezembro de 2001.

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

Godry, Renata Cristina  
G589d Detecção de espécies incomuns de micoplasmas e do plasmídeo  
de resistência "tetM" em material cervical de gestantes por técnicas  
moleculares / Renata Cristina Godry. -- São Paulo, 2001.  
111p.

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

Orientador: Cunha, Regina Ayr Flório da

I. Diagnóstico molecular : Medicina I. T. II. Cunha, Regina  
Ayr Flório da, orientador.

616.0756 CDD

RENATA CRISTINA GODRY

DETECÇÃO DE ESPÉCIES INCOMUNS DE MICOPLASMAS  
E DO PLASMÍDEO DE RESISTÊNCIA “*tetM*”  
EM MATERIAL CERVICAL DE GESTANTES  
POR TÉCNICAS MOLECULARES.

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha  
orientador/presidente

Rosângela Verlengia  
1º. examinador

Arthur Gruber  
2º. examinador

São Paulo, 20 de dezembro de 2001.

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

**Apoio Financeiro: bolsa CAPES e  
FAPESP processo nº 99/07387-9.**

## **AGRADECIMENTOS**

---

**A DEUS**  
por ter me dado a chance  
de conhecer o maior mistério: A VIDA

---

Dedico este trabalho a minha família.

Em especial agradeço aos meus avós  
Anselmo e Maria,  
que me ajudaram a construir o que sou hoje,  
por todo carinho, amor, compreensão pelas minhas ausências, e  
exemplo de honestidade que procuro seguir.

A minha mãe, minha saudade.

A minha irmã, minha alegria e meu carinho.

A tia Neide e tio Célio, pelo incentivo e carinho, minha gratidão.

---

---



Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única. E nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, mas não vai só e nem deixa-nos sós; leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada, há os que deixam muito, há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade das nossas vidas e a prova evidente que dois espíritos não se encontram ao acaso. E, àquelas que de mim, nada levaram, minhas desculpas e, àquelas que para mim, algo deixaram, os meus agradecimentos.

---

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Profa. Dra. Regina Ayr Flório da Cunha, pela orientação, apoio, compreensão, muita paciência, exemplo de caráter e ética profissional em todos os momentos.

A Profa. Dra. Kioko Takei, da disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelas inestimáveis contribuições, atenção e sugestões, desde o início na intermediação da obtenção das amostras clínicas, até o final no Exame de Qualificação.

A Profa. Dra. Adelaide José Vaz, da disciplina de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo agradável convívio, momentos de ensinamentos e apoio.

A Profa. Dra. Yoshimi I. Yamamoto, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e a Profa. Dra. Rosângela Verlengia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo, pelas sugestões e colaboração no Exame de Qualificação, que nos permitiu aprimorar este trabalho.

A equipe do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, em nome do seu chefe Dr. Humberto Gazzi Lippi e dos médicos Dr. Teiji Asanuma e Dra. Ighes Medici, pela disposição e auxílio na obtenção das amostras.

Ao Dr. Alan Blanchard, da INRA - Universidade Vitor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux, França, pelo auxílio na solução de algumas dúvidas e problemas.

Ao Dr. Rosalvo Guidolin, chefe da Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção do Instituto Butantan, pelos soros de cavalos que foram gentilmente cedidos, para a preparação dos meios de cultura.

Aos amigos Ednéia, Marcos, Simone, Caio, Samira, pelo carinho, paciência, incentivo, infindável apoio, e sincera amizade ao longo destes anos.

A Evelise, pela grande ajuda, principalmente no início desta jornada.

A Luzia, pela amizade e calorosa hospitalidade.

A todos os docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, principalmente aos pós-graduandos do laboratório de Imunologia Clínica, Alessandra, Juliana, Noeli, Márcia e a técnica, Silene, pela oportunidade de convívio, pelas conversas, muitas risadas, outras vezes lágrimas, e tenham certeza que a maior saudade deste período será a amizade.

Devo gratidão à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu Diretor, Prof. Titular Jorge Mancini Filho; ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo, em nome da sua chefe, Profa. Associada Dulcinéia S. P. Abdalla. E, em especial à Coordenadoria de pós-graduação em Farmácia, área de Análises Clínicas, em nome de sua presidente, Profa. Dra. Primavera Borelli, pelo apoio e ajuda.

A todos os pacientes, que voluntariamente aceitaram doar suas amostras e participar deste projeto, sem os quais não seria possível.

A todos que não foram mencionados, mas direta e indiretamente contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

Finalmente, a **DEUS** por eu ter tanto a agradecer.

---

---

## SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<i>ii</i>
<u>LISTA DE TABELAS</u>	<i>vii</i>
<u>ABREVIATURAS</u>	<i>viii</i>
<u>ABSTRACT</u>	1
<u>RESUMO</u>	5
<u>1- INTRODUÇÃO</u>	9
<u>2- OBJETIVOS</u>	31
<u>3- MATERIAIS E MÉTODOS</u>	33
<u>3.1- AMOSTRAGEM</u>	34
3.1.1- Material clínico	34
* Fluxograma do processamento das amostras coletadas	35
<u>3.2- CULTURA DOS MICOPLASMAS</u>	36
3.2.1- Meios de cultura	36
3.2.2- Semeadura	36
3.2.3- Identificação dos isolados	37
3.2.4- Identificação sorológica de <i>Mycoplasma hominis</i> isolados das amostras clínicas pela técnica de OUCHTERLONY	38
3.2.5- Quantificação dos isolados	39

<b><u>3.3- TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS</u></b>	<b>40</b>
3.3.1- <b><u>REAGENTES E MATERIAIS</u></b>	<b>40</b>
3.3.2- <b><u>EQUIPAMENTOS</u></b>	<b>41</b>
3.3.3- <b><u>PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA REALIZAÇÃO DA PCR</u></b>	<b>41</b>
3.3.3.1- Extração do DNA micoplásmico	41
3.3.3.2- Protocolo básico para realização da PCR multiplex para micoplasma genérico, gene da globina e DNA plasmidial pBr <sub>322</sub>	42
3.3.3.2a- DNA micoplásmico	43
3.3.3.2b- Gene da globina	44
3.3.3.2c- DNA plasmidial pBR <sub>322</sub>	44
3.3.4- <b><u>PCR ESPECÍFICO PARA ESPÉCIES DE MICOPLASMAS</u></b>	<b>45</b>
3.3.5- <b><u>ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DAS REGIÕES AMPLIFICADAS ATRAVÉS DA PCR PARA MICOPLASMAS</u></b>	<b>48</b>
♦ <i>Mycoplasma penetrans</i>	49
♦ <i>Mycoplasma genitalium</i>	49
♦ <i>Mycoplasma fermentans</i>	50
♦ <i>Mycoplasma hominis</i>	50
3.3.6- <b><u>IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO <i>Ureaplasma</i> spp</u></b>	<b>51</b>
A- Determinação das espécies do gênero <i>Ureaplasma</i> spp	52
B- Identificação dos sorotipos de <i>Ureaplasma parvum</i>	52
C- Identificação dos subtipos de <i>Ureaplasma urealyticum</i>	52
3.3.7- <b><u>Detecção do plasmídeo "tetM"</u></b>	<b>56</b>
<b><u>4- RESULTADOS</u></b>	<b>57</b>
4.1- <b><u>CULTURA DOS MICOPLASMAS</u></b>	<b>58</b>
4.2- <b><u>QUANTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS: <i>Ureaplasma</i> spp e <i>Mycoplasma hominis</i></u></b>	<b>60</b>
4.3- <b><u>IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE <i>Mycoplasma hominis</i></u></b>	<b>61</b>

---

<b>4.4- IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS ATRAVÉS DA PCR</b>	<b>61</b>
4.4.1- PCR específica para detecção de <i>Mycoplasma penetrans</i>	64
4.4.2- PCR específica para detecção de <i>Mycoplasma genitalium</i>	65
4.4.3- PCR específica para detecção de <i>Mycoplasma fermentans</i>	66
4.4.4- PCR específica para detecção de <i>Mycoplasma hominis</i>	67
4.4.5- PCR específica para identificação das espécies <i>Ureaplasma urealyticum</i> e <i>Ureaplasma parvum</i>	68
⇒ Determinação de biotipos do gênero <i>Ureaplasma spp</i>	68
⇒ Determinação de sorotipos de <i>Ureaplasma parvum</i>	70
⇒ Determinação de subtipos de <i>Ureaplasma urealyticum</i>	72
<b>4.5- PCR específico para detecção do plasmídeo "tetM" em amostras cervicais positivas para <i>Ureaplasma spp</i> e <i>Mycoplasma spp</i></b>	<b>74</b>
<b>5- DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
<b>6- REFERÊNCIAS</b>	<b>83</b>
<b>7- ANEXOS</b>	<b>102</b>

***LISTA DE FIGURAS E TABELAS***

---

---

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 01:** Resultado do cultivo em meios líquidos e sólidos obtidos das amostras clínicas de 117 gestantes. 58

**Figura 02:** Colônias de *Ureaplasma urealyticum* em meio sólido A7 (aumento de 100x). 59

**Figura 03:** Distribuição do resultado de 74 culturas positivas para as espécies dos gêneros *Ureaplasma spp* e *Mycoplasma spp*. 59

**Figura 04:** Colônias de *Mycoplasma spp* em meio sólido A7 (aumento de 100x). 60

**Figura 05:** Imunodifusão dupla de OUCHTERLONY em gel de ágar. A linha de identidade pode ser observada para as 6 amostras (mais um controle positivo) ao redor do orifício central contendo soro imune anti-*Mycoplasma hominis*. 61

**Figura 06:** Resultados observados na pesquisa de micoplasmas pela PCR nas amostras clínicas de 117 gestantes estudadas. 63

**Figura 07:** Distribuição das espécies de micoplasmas detectadas através da Reação em Cadeia pela Polimerase, em amostras de 86 gestantes positivas para micoplasmas. 63

---



---

**Figura 08:** Frequência das espécies de micoplasmas, encontrada em 27 casos de co-infecções. 64

**Figura 09:** PCR para *Mycoplasma penetrans* com uso da enzima de restrição *Avall* para verificação da especificidade do fragmento amplificado de 410 pb, resultando em fragmentos de 269 e 141 pb, após digestão. 1 e 8) marcador de peso molecular 100 pb. 2 e 4) amostras positivas sem digestão; 3 e 5) amostras positivas após digestão; 5-6) controles positivos. 65

**Figura 10:** PCR para *Mycoplasma genitalium* com amplificação do fragmento de 809 pb. 1) 100 pb marcador de peso molecular; 2) controle positivo; 3) controle negativo; 4 a 11) amostras negativas; 12 e 13) amostras positivas para a amplificação do fragmento de 809 pb. 65

**Figura 11:** PCR para *M. genitalium* com uso da enzima de restrição fragmentos de 608 e 201 pb. 1) 100 pb marcador de peso molecular; 2) controle positivo sem digestão; 3) controle positivo após digestão com *Xbal*; 4 e 6) amostras positivas sem digestão; 5 e 7) amostras positivas após digestão com *Xbal*. 65

**Figura 12:** PCR específica para *M. fermentans* com uso da enzima de restrição *Ava II*. 1) 100 pb: marcador de peso molecular; 2) controle positivo sem digestão; 3) controle positivo após digestão; 4) amostra positiva sem digestão; 5) amostra positiva com digestão. 66

**Figura 13:** PCR específica para *M. fermentans* com uso da enzima de restrição *Avall*. 1) 100 pb: marcador de peso molecular; 2) controle positivo sem digestão; 3) controle positivo após digestão; 4-6-8-12) amostras positivas sem digestão; 5-7-9-13) amostras positivas com digestão; 10 e 11) controles negativos. 66

---

**Figura 14:** PCR específica para *M. fermentans* com o segundo par de “primers” utilizado, resultando na amplificação do produto de 206 pb. 1) 100 pb: marcador de peso molecular; 2) controle positivo; 3) controle negativo; 4-6 e 8-14) amostras positivas; 7) amostra negativa. 67

**Figura 15:** Resultado da PCR em amostras positivas de *Mycoplasma hominis*. Nesta reação foi utilizado o primeiro par de “primers” que resultou na amplificação de um produto com 589 pb. Sua especificidade foi revelada através da digestão com a enzima de restrição *KpnI*, resultando em produtos de 299 e 290 pb. 1) marcador de peso molecular 100 pb. 2 e 3) controles positivos. 4 e 6) amostras positivas antes da digestão. 5-7 e 8) amostras positivas após a digestão. 68

**Figura 16:** Identificação dos 71 isolados do gênero *Ureaplasma spp* nas espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, através da Reação em Cadeia pela Polimerase. 69

**Figura 17:** Reação em Cadeia pela Polimerase para *Ureaplasma* com detecção das espécies *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* com os “primers” UMS 125/ UMS 226. 1)  $\phi$ X174 DNA/*HaeIII*: marcador de peso molecular; 2) controle negativo; 3) controle positivo de 448 pb para *U. urealyticum*; 4) controle positivo de 403-404 pb para *U. parvum*; 1 a 14) amostras das pacientes. 69

**Figura 18:** Reação em Cadeia pela Polimerase para determinação dos sorotipos 3/14 de *Ureaplasma parvum* com os “primers” UMS 125/ UMA269. 1) padrão de peso molecular:  $\phi$ X174 DNA/*HaeIII*; 2) controle positivo: 442 pb; 3) controle negativo; 4-5-8-9-10-12-13) amostras negativas; 6-7 e 11) amostras positivas. 71

---

**Figura 19:** Reação em Cadeia pela Polimerase para determinação dos sorotipos 1 e 6 de *Ureaplasma parvum*. Primeira etapa com os “primers” UMS 125/ UMA 269’. 1) padrão de peso molecular:  $\phi$ X174 DNA/HaeIII; 2) controle positivo: 442, 443 pb; 3) controle negativo; 5-6-7-11-12) amostras positivas; 4-8-9-10) amostras negativas. 71

**Figura 20:** Reação em Cadeia pela Polimerase para determinação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum*, com análise do perfil de restrição para diferenciação entre os sorotipos 1 e 6 com a enzima *Hinf*I. 1) padrão de peso molecular:  $\phi$ X174 DNA/HaeIII; 2) amostra positiva para as sorovariedades 1 e 6: “mix”; 3) amostra positiva para sorovariedades 1: “cut”; 4-5-6-7-8) amostras positivas para sorovariedades 6: “uncut”. 71

**Figura 21:** Reação em Cadeia pela Polimerase para determinação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum*, com os “primers” UMS 54/ UMA 269’, específicos para identificação da sorovariedade 6. 1) padrão de peso molecular:  $\phi$ X174 DNA/HaeIII; 2) controle negativo; 3) controle positivo para sorovariedade 6; 4-5-6-8-9) amostras positivas para sorovariedade 6; 6-10) amostras negativas. 72

**Figura 22:** Reação em Cadeia pela Polimerase para determinação dos subtipos da espécie *Ureaplasma urealyticum*, com uso dos “primers” UMS 61/UMA 219’, específicos para subtipo 3, resultando em um produto amplificado de 328 pb . 1) marcador de peso molecular 100 pb; 2) controle positivo; 13) controle negativo; 3-6-10) amostras positivas; 4-5-7-8-9-11-12) amostras negativas. 73

**Figuras 23:** Reação em Cadeia pela Polimerase para determinação dos subtipos da espécie *Ureaplasma urealyticum*, com uso dos “primers” UMS 112’/UMA 194’ específicos para subtipo 2, resultando em um produto amplificado de 356 pb. 1, 2, 3, 5 a 8) amostras positivas; 4) amostra

---

negativa; 9) controle positivo; 10) marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder. 73

**Figura 24:** Reação em Cadeia pela Polimerase para determinação dos subtipos da espécie *Ureaplasma urealyticum*, com uso dos “primers” UMS 112/UMA 194, específicos para subtipo 1/3, resultando em um produto amplificado de 356 pb. 1 e 15) marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder; 2) controle positivo; 3) controle negativo; 4-7-9-12-14) amostras positivas; 5-6-8-10-11-13) amostras negativas. 73

**Figura 25:** PCR específica para detecção do plasmídeo “*tetM*” com amplificação do produto de 397 pb: 1 e 15) marcador de peso molecular; 2) controle positivo; 1 a 14) amostras testadas. 74

**Figura 26:** PCR para detecção do plasmídeo “*tetM*” com análise do perfil de restrição através da enzima de restrição *Taq I*. O tamanho dos produtos de amplificação foram: 190 pb, 130 pb e 77 pb. 1) marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder; 2) controle positivo sem análise; 3) controle positivo com *Taq I*; 4 e 5) amostras negativas; 6 e 8) amostras positivas sem *Taq I*; 7 e 9) amostras positivas com *Taq I*. 74

---

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela I:** Descrição dos pares de “*primers*” (denominação e seqüência) utilizados na PCR específica para identificação de *M. penetrans*, *M. genitalium*, *M. hominis* e *M. fermentans*. 46

**Tabela II:** Descrição dos pares de “*primers*” (concentração, produto amplificado e referência bibliográfica) utilizados na PCR específica para identificação de *M. penetrans*, *M. genitalium*, *M. hominis* e *M. fermentans*. 47

**Tabela III:** Enzimas de restrição e condições empregadas na verificação da especificidade dos fragmentos amplificados pela PCR específica para cada espécie de micoplasma. 48

**Tabela IV:** Distribuição dos micoplasmas em 86 amostras positivas por PCR. 62

**Tabela V:** Resultado das amostras positivas para a determinação dos biotipos dos isolados do gênero *Ureaplasma spp*, através da PCR. 69

**Tabela VI:** Resultado da determinação dos sorotipos de *U. parvum* através da PCR em 54 amostras positivas. 70

**Tabela VII:** Resultado das amostras clínicas positivas para a identificação dos subtipos dos 17 isolados da espécie *Ureaplasma urealyticum*, através da PCR. 72

## ***ABREVIATURAS***

---

---

## **ABREVIATURAS**

- \* AIDS- Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
  - \* ATP- adenosina trifosfato
  - \* pb- pares de bases
  - \* CCU (Color Changing Units)– unidades de alteração de cor
  - \* CD4- Linfócitos T CD4 positivos
  - \* CD8- Linfócitos T CD8 positivos
  - \* CD25- Linfócitos T CD25 positivos
  - \* CD69- Linfócitos T CD69 positivos
  - \* DNA- Ácido desoxirribonucléico
  - \* dNTP- desoxirrinucleotídeo trifosfato
  - \* DST- Doenças Sexualmente Transmissíveis
  - \* ELISA- “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
  - \* G + C- guanina + citosina
  - \* fg- fentograma
  - \* HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
  - \* HLA- “Human Leukocyte Antigen”
  - \* IgA- Imunoglobulina A
  - \* IgM- Imunoglobulina M
  - \* kD- kilo Dalton
  - \* LAMP- “Lipid Associated Membrane Proteins”
  - \* MBA- Múltipla Banda Antigênica
  - \* PCR- Reação em Cadeia pela Polimerase
  - \* PID- Doença Inflamatória Pélvica
  - \* RNA- Ácido ribonucléico
-

- 
- x TGU- Trato genitourinário
  - x TNF- Fator de necrose tumoral
  - x UNG- Uretrite não gonocócica
  - x g- grama
  - x mg- miligrama
  - x mL- mililitro
  - x  $\mu\text{g}$ - micrograma
  - x  $\mu\text{L}$ - microlitro
  - x  $\mu\text{M}$ - micromolar



***ABSTRACT***

---

## **ABSTRACT**

The international literature is still concerning about the mycoplasma participation in human diseases mainly in what refer to the involvement of species like the *Ureaplasma spp.* and the *Mycoplasma hominis* in cases of infertility and perigestational altering. Studying the recent literature that reported the presence of less isolated mycoplasma species, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma fermentans* of HIV patients in our population, brought us the idea of this general picture study showing the less common species in cases of pregnant women, in addition to the *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* and *M. hominis*. We were have to trying to analyze the presence of the plasmid "*tetM*" in the isolated strains, responsible for the resistance of tetracycline observed in cases of persistent infection.

Samples of the cervical material of 117 pregnant women during various pregnancy stages were evaluated. The procedure was to have the culture with identification and quantification of the isolated and PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizing generic and specific "*primers*" for each one of the species. Toward this, techniques and procedures, which were already standardized by the international literature, were used.

These analyzed data have shown the presence of all the mycoplasma species that were under research in the population of this study. The results of the clinical samples culture in solid as well as in liquid means

have shown a high presence rate of 63,2% (74/117) in it. Among them, *Ureaplasma spp.* was present in 91,9% (68/74) of the patients, in which it was detected in significant concentrations; higher or equal to  $10^4$  CCU/ $\mu$ L in 82,4% (61/74) of the patients through the microtitration technique in U10 liquid means. It was observed 6,8% (5/74) of co-infection between *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma spp.* and in only 1,3% (1/74) *Mycoplasma spp.*, all of them higher or equal to  $10^3$  CCU/ $\mu$ L.

The infection rate obtained by the PCR in our study was of 73,5% (86/ 117) for mycoplasmas, and it has shown to be 2,3% (2/86) positive only for *Mycoplasma penetrans*; 7,0% (6/86) for *Mycoplasma fermentans*; 4,7% (4/86) for *Mycoplasma hominis*; 54,7% (47/86) for *Ureaplasma spp.* and 31,3% (27/86) for the co-infection. In these co-infections it was seen: 3,7% (1/27) for *M. penetrans* and *Ureaplasma spp.*; 14,8% (4/27) for *M. genitalium* and *Ureaplasma spp.*; 33,3% (9/27) for *M. fermentans* and *Ureaplasma spp.*; 11,1% (3/27) for *M. genitalium* and *M. fermentans*; 18,6% (5/27) for *M. hominis* and *Ureaplasma spp.*; 11,1% (3/27) for *M. fermentans*, *M. genitalium* and *Ureaplasma spp.*; 3,7% (1/27) for *M. genitalium*, *M. hominis* and *Ureaplasma spp.* e 3,7% (1/27) for *M. fermentans*, *M. hominis* and *Ureaplasma spp.*

*M. penetrans* was detected in 3/86 (3,5%) samples, *M. genitalium* was found in 12,8% (11/86); *M. fermentans* in 25,6% (22/86) of the patients; *M. hominis* was positive in 12,8% (11/86) and detecting the *Ureaplasma spp.* through this technique has shown us its prevalence in 82,6% (71/86) of the samples. Among them, 76,0% (54/71) were identified as *Ureaplasma parvum* and 12,7% (9/71) as *Ureaplasma urealyticum* and 11,3% (8/71) of co-infection on the biotype samples. It was shown in the *Ureaplasma parvum* sera-type process, 7,4% (4/ 54) positive for sera-type 1; 25,9% (14/ 54) for sera-type 6; and 35,2% (19/ 54) for the sera-types 3/14. Co-infections between the sera-types were observed. The results of the subtype process concerning the *Ureaplasma urealyticum* have shown subtype 2, subtype 1/3 and some co-infections.

The presence of the tetracycline resistance plasmid "*tetM*" was studied through the PCR in all the samples which were positive for *Mycoplasma hominis* and for *Ureaplasma spp.*, and it was observed in 4/11 (36,4%) of the *Mycoplasma hominis* and 42/71 (59,2%) of the *Ureaplasma spp.* cases. The presence of the "*tetM*" is important in the evaluation of the treatment to be prescribed since it has been observed that the resistance of the mycoplasma to the tetracycline and its derivations has been more frequent.

In Brazil, this was a pioneer study and we believe it can contribute for a better knowledge about the mycoplasma role in human pathologies. These data about the presence of species like the *M. penetrans*, *M. genitalium*, the high incidence of *M. fermentans* and the detection of *M. hominis* and *Ureaplasma spp.*, as well as the co-infections, confirm the high incidence of these microorganisms in our environment. We have still known little about the actual role of the mycoplasmas infecting pregnancy and the consequences they will bring them, however we hope that through this study we will emphasize how important it is to conduct a wide research about the several species of mycoplasmas affecting our population.

**RESUMO**

---

## **RESUMO**

Até o momento são contraditórios os dados da literatura internacional quanto a participação dos micoplasmas nas doenças humanas, especialmente o envolvimento de espécies do gênero *Ureaplasma spp.* e da espécie *Mycoplasma hominis* em casos de infertilidade e alterações perigestacionais. Ao considerarmos dados recentes da literatura reportando a existência de espécies menos isoladas de micoplasmas, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma fermentans* em pacientes HIV positivos em nossa população, foi proposto através deste trabalho, mostrar uma visão geral da participação destas espécies mais incomuns, além de *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* e *M. hominis* em gestantes. Foi também nosso objetivo nas cepas isoladas, verificar a existência do plasmídeo "tetM" responsável pela resistência à tetraciclina observada em casos de infecção persistente.

Foram avaliadas amostras de material cervical de 117 gestantes em várias idades gestacionais, que compreendeu: o cultivo com identificação e quantificação dos isolados e PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), utilizando-se "primers" genéricos e específicos para cada espécie. Para isso, foram utilizadas técnicas e procedimentos já padronizados na literatura internacional.

Os dados analisados demonstraram a presença de todas as espécies de micoplasmas pesquisadas na população estudada. Resultados do cultivo das amostras clínicas em meios sólidos e líquidos mostraram uma alta

taxa de positividade de 63,2% (74/117). Destes, *Ureaplasma spp.* estava presente em 91,9% (68/74) das pacientes, as quais foram detectadas em concentrações significativas; maiores ou iguais a  $10^4$  CCU/mL em 82,4% (61/74) das pacientes através da técnica de microtitulação em meio líquido U10. Foram observados 6,8% (5/74) de co-infecção entre *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma spp.* e em apenas 1,3% (1/74) *Mycoplasma spp.*, sendo todas superiores ou iguais a  $10^3$  CCU/mL.

A taxa de infecção obtida através da PCR em nosso estudo foi de 73,5% (86/ 117) para micoplasmas, sendo 2,3% (2/86) positivos somente para *Mycoplasma penetrans*; 7,0% (6/86) para *Mycoplasma fermentans*; 4,7% (4/86) para *Mycoplasma hominis*; 54,7% (47/86) para *Ureaplasma spp.* e 31,3% (27/86) para as co-infecção. Nestas co-infecções foram encontrados: 3,7% (1/27) para *M. penetrans* e *Ureaplasma spp.*; 14,8% (4/27) para *M. genitalium* e *Ureaplasma spp.*; 33,3% (9/27) para *M. fermentans* e *Ureaplasma spp.*; 11,1% (3/27) para *M. genitalium* e *M. fermentans*; 18,6% (5/27) para *M. hominis* e *Ureaplasma spp.*; 11,1% (3/27) para *M. fermentans*, *M. genitalium* e *Ureaplasma spp.*; 3,7% (1/27) para *M. genitalium*, *M. hominis* e *Ureaplasma spp.* e 3,7% (1/27) para *M. fermentans*, *M. hominis* e *Ureaplasma spp.*.

Na avaliação individual das espécies através da PCR, *M. penetrans* foi detectado em 3/86 (3,5%) amostras, *M. genitalium* ocorreu em 12,8% (11/86); *M. fermentans* em 25,6% (22/86) das pacientes; *M. hominis* foi positivo para 12,8% (11/86) e a detecção de *Ureaplasma spp.* por esta técnica revelou uma prevalência de 82,6% (71/86) das amostras. Destes, 76,0% (54/71) identificados como *Ureaplasma parvum* e 12,7% (9/71) como *Ureaplasma urealyticum* e 11,3% (8/71) de co-infecção entre as amostras dos biotipos. Dentro da identificação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum*, mostramos uma positividade de: 7,4% (4/ 54) para o sorotipo 1; 25,9% (14/ 54) para o sorotipo 6; 35,2% (19/ 54) para os sorotipos 3/14. Co-infecções entre os sorotipos foram observados. Os resultados da determinação dos subtipos de *Ureaplasma urealyticum* demonstraram subtipo 2; subtipo 1/3 e algumas co-infecções.

A presença do plasmídeo de resistência "*tetM*" foi investigada através da PCR, em todas as amostras positivas para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp.*, sendo observada em 4/11 (36,4%) dos *Mycoplasma hominis* e 42/71 (59,2%) de *Ureaplasma spp.*. A detecção do "*tetM*" torna-se importante na avaliação do tratamento a ser empregado, uma vez que tem sido observado um aumento na frequência da resistência dos micoplasmas às tetraciclina e seus derivados.

No Brasil, este estudo foi inédito e acreditamos poder contribuir para um melhor entendimento do papel dos micoplasmas nas patologias humanas. Estes dados sobre a presença de espécies como *M. penetrans*, *M. genitalium*, a alta incidência de *M. fermentans* e a detecção de *M. hominis* e *Ureaplasma spp.*, assim como as co-infecções, confirmam a alta frequência destes microrganismos em nosso meio. Ainda pouco se conhece sobre o real papel dos micoplasmas na infecção materna e suas consequências, todavia, com este estudo esperamos demonstrar a importância de um estudo mais amplo de várias espécies de micoplasmas em nossa população.



## **INTRODUÇÃO**

---

## 1- INTRODUÇÃO

O isolamento da primeira espécie de micoplasma, durante um surto de pleuropneumonia bovina contagiosa, data de mais de cem anos (NOCARD & ROUX, 1898). Entretanto, à medida que os conhecimentos a respeito destes microrganismos foram se ampliando, maiores foram se tornando as questões sobre o seu real papel nas diversas patologias humanas em que são implicados. As associações entre infecções por certas espécies de micoplasma e complicações da gravidez, como febre puerperal e aborto, levando até à infertilidade (TAYLOR-ROBINSON, 1988), o descobrimento de novas espécies, envolvidas inclusive com a infecção pelo HIV (AINSWORTH *et al.*, 1994; LO *et al.*, 1989a; LO *et al.*, 1991), e a crescente resistência destes microrganismos aos antibióticos (DUFFY *et al.*, 2000; HANNAN & WOODNUTT, 2000; TAYLOR-ROBINSON & BÉBÉAR, 1997; TAYLOR-ROBINSON & FURR, 2000), têm demonstrado a carência de estudos a respeito de sua prevalência e envolvimento em doenças em certos grupos de pacientes, notoriamente em gestantes.

Os micoplasmas são procariotos pertencentes à classe *Mollicutes* (do latim, *molli*, suave; *cutes*, cútis, pele), nome que originalmente se deve à peculiar característica da total ausência de parede celular. Seu citoplasma está envolvido somente por uma membrana trilaminar de natureza lipoproteica. O termo *Mollicutes* foi proposto por EDWARD e FREUND em 1967, denominando assim a classe, estabelecida mais tarde como pertencente à ordem *Mycoplasmatales*, divisão *Tenericutis* (Comitê Internacional - Subcomitê de Sistemática e Taxonomia Bacteriana de *Mollicutes*, 1995).

---

Com o avanço dos conhecimentos científicos sobre ultra-estrutura, membrana celular, genoma e via metabólica dos micoplasmas, nas décadas de 1960 e 1970, estes foram reconhecidos como os menores e mais simples organismos que se autoduplicam (RAZIN & FREUNDT, 1984). O processo de replicação pode ocorrer simultaneamente por fissão binária e fragmentação filamentososa, dando origem a corpúsculos cocóides ou a formas filamentosas, respectivamente. Talvez, devido ao imenso pleomorfismo, não haja outro grupo de microrganismos que tenha causado tanta controvérsia e confusão, para sua identificação e taxonomia, quanto os micoplasmas. Extremamente diminutos, são singulares entre os procariotos, diferindo em algumas características de todos os outros principais grupos de patógenos humanos, como a necessidade de esteróis para o seu crescimento (LADEFOGED, 2000).

Estes microrganismos são classificados como filogeneticamente relacionados às bactérias Gram positivas (BEHBAHANI *et al.*, 1993). Seu genoma circular de fita dupla é caracterizado pelo seu pequeno tamanho e baixo conteúdo de G + C. Algumas espécies patogênicas reorganizam seu DNA, por meio da replicação de seqüências gênicas através de "transposon", promovendo uma diversidade genética e maximizando o potencial de codificação de proteínas (WOESE *et al.*, 1980). Em contraste com as variantes fase L de bactérias, os micoplasmas são incapazes de sintetizar precursores de parede celular, em qualquer condição (RAZIN, 1985). Pela falta de citocromos, são dependentes quase que totalmente de substratos da fosforilação como fonte de energia (POLLACK *et al.*, 1997). A membrana celular dos micoplasmas possui fosfolípidios, glicolípidios, colesterol e várias proteínas. A falta de uma estrutura rígida, como a camada peptidoglicana, propicia alta elasticidade e morfologia irregular, sendo estas características responsáveis pelas dificuldades nas pesquisas sobre seu ciclo celular e sua caracterização morfológica (RAZIN *et al.*, 1998).

### **Mecanismos de Patogenicidade:**

Vários estudos afirmam que as espécies de micoplasmas podem ser classificadas em dois grupos de acordo com a morfologia celular: o primeiro constituído de espécies que possuem uma estrutura polar, caracterizada por uma organela cuja função principal é a de adesão à célula hospedeira, sendo muitas vezes, responsável por uma motilidade deslizante, e o segundo constituído de espécies desprovidas de tal estrutura (MIYATA & SETO, 1999). Esta estrutura responsável pela adesão e motilidade é composta por proteínas, denominadas adesinas e por proteínas acessórias. A adesão é realizada provavelmente através dos sialoglicoconjugados e glicolipídios sulfatados da célula hospedeira. As adesinas têm sido muito bem caracterizadas em algumas espécies de micoplasmas. Na espécie *Ureaplasma urealyticum*, a cito-aderência acontece por meio de uma estrutura denominada glicocálice (DE SILVA *et al.*, 1991). A adesão micoplásmica à célula hospedeira é um pré-requisito para que ocorra a colonização e a infecção (WAYTES *et al.*, 1993).

Como consequência de duas de suas características principais: a incapacidade de sintetizar algumas de suas moléculas para seu metabolismo e uma certa dependência do meio externo com o qual interagem. Os micoplasmas têm uma necessidade de utilizar alguns componentes da célula hospedeira, constituindo-se em alguns dos mecanismos de patogenicidade (MIYATA & SETO, 1999).

A fusão das membranas do micoplasma com a do hospedeiro, facilitada pela falta da parede celular, é possivelmente um dos mecanismos de patogenicidade, o qual foi melhor compreendido a partir das observações realizadas em algumas espécies já sequenciadas como *Mycoplasma pneumoniae* e *Mycoplasma genitalium*. Tal interação tem como consequência o surgimento de um microambiente que possibilita um acúmulo de produtos tóxicos excretados pelo microrganismo, tais como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ânions superóxidos e amônia, maléficos aos

tecidos do hospedeiro por não inibirem a catalase endógena, provocando a diminuição da superóxido dismutase (GLASS *et al.*, 2000). Este processo, tornando-se contínuo, produzirá danos oxidativos aos compartimentos vitais da célula hospedeira. Estudos experimentais mostram que micoplasmas, como as espécies do gênero *Ureaplasma spp.* possuem fosfolipases na membrana, cuja ação direta nos fosfolipídios do hospedeiro pode acarretar em produção de ácido araquidônico, diacilglicerol e lisofosfolipídeos, que são substâncias capazes de promover a alteração da biossíntese de prostaglandinas e das funções normais da célula do hospedeiro. Além disso, algumas espécies estimulam a produção de citocinas a partir de macrófagos, aumentando também a atividade de prostaglandinas. Considerando-se que um dos efeitos do aumento de prostaglandinas é a estimulação uterina, a participação destes microrganismos em insucessos da gestação tem sido considerada (McDONALD *et al.*, 1992). O processo de produção de energia, utilizado pelos ureaplasmas através da hidrólise da uréia, é talvez o seu principal mecanismo de patogenicidade. Esta hidrólise gera um gradiente eletroquímico, o qual promove um potencial químico osmótico que gera ATP, com acúmulo intracelular de amônia (GLASS *et al.*, 2000).

Geralmente os micoplasmas habitam as superfícies mucosas, principalmente as dos tratos urogenital e respiratório, restringindo-se à superfície e raramente penetrando na submucosa. Entretanto, em contraste com a maioria das espécies de micoplasmas que são extracelulares, *M. fermentans* e *M. penetrans* podem apresentar-se primariamente como intracelulares (LO, 1991b; TAYLOR-ROBINSON, 1991). Esta localização intracelular pode ser um dos fatores de proteção destes microrganismos contra anticorpos e antibióticos, contribuindo para a cronificação de suas infecções. Esta persistência micoplásmica pode ser favorecida pela variação antigênica nas suas proteínas de superfície e também pela capacidade de provocar alterações do sistema imune (STYLER & SHAPIRO, 1985).

Várias espécies de micoplasmas isoladas do homem, são reconhecidamente causadoras de pneumonia, artrites, processos reumáticos e várias outras patologias. Espécies como *Mycoplasma penetrans*,

*Mycoplasma pirum* e *Mycoplasma fermentans* podem atuar como co-fatores na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (MONTAGNIER & BLANCHARD, 1993; BRENNER *et al.*, 1997). No trato urogenital, espécies do gênero *Ureaplasma spp.* e a espécie *Mycoplasma hominis*, são comumente implicadas como principais causadoras de infecções, alterações perigestacionais e distúrbios da reprodução, como infertilidade, abortos espontâneos, nascimentos de natimortos, partos de prematuros e crianças com baixo peso, entre outras (KOCH *et al.*, 1997). Porém, tanto quanto as espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*, cuja participação é comprovada em alterações perigestacionais, tem sido atribuída uma prevalência significativa aos micoplasmas menos frequentemente isolados nestes casos, o que poderia indicar também um papel importante de tais espécies.

#### ***Susceptibilidade aos antimicrobianos e mecanismos de resistência:***

Quanto ao tratamento, a infecção micoplásmica é geralmente dentre as etiologias prováveis, a última hipótese diagnóstica. Devido às características morfológicas dos micoplasmas, estes não são susceptíveis a penicilina e outros antibióticos que agem nas estruturas da parede celular das bactérias em geral, mas são sensíveis a uma variedade de antibióticos de largo espectro (TAYLOR-ROBINSON & BÉBÉAR, 1997). As tetraciclina e doxaciclina são utilizadas na maior parte das infecções micoplásmicas humanas enquanto que os macrolídeos tais como: eritromicina, azitromicina, lincomicina, clindamicina, rifampicina, também podem ser usados como uma alternativa terapêutica (TAYLOR-ROBINSON & FURR, 2000).

Entretanto, após insucessos na terapia antimicrobiana, estudos sobre mecanismo de ação, regulação de expressão, mobilidade genética e distribuição de determinantes de resistência, mostram que a aquisição de novos genes por vários microrganismos estão frequentemente associados a

mobilidade plasmidial ou "transposons". E especialmente, a resistência a tetraciclina pode ser primariamente devido ao efluxo de energia dependente da tetraciclina ligadas a proteínas ou a proteção dos ribossomos a ação deste antibiótico (ROBERTS, 1996). A resistência a esta droga em bactérias é codificada por diferentes determinantes genéticos e nos micoplasmas somente têm sido descrito o plasmídeo "*tetM*". A detecção específica deste plasmídeo pode ser observada por PCR, apresentando uma excelente correlação com as técnicas de diluições em ágar e meios de cultura já utilizados (BLANCHARD *et al.*, 1992). Assim, sua identificação em cepas isoladas de amostras clínicas pode ser necessária à definição do tratamento a ser empregado nos pacientes, favorecendo a um melhor resultado contra as infecções causadas por estes microrganismos.

Segundo HANNAN & WOODNUTT (2000) a doxaciclina mostrou-se por sua vez menos ativa, enquanto os macrolídeos, principalmente a azitromicina, mostrou uma maior atividade sobre *Mycoplasma pneumoniae* e *Mycoplasma genitalium*, sendo, contudo, menos ativa contra *Mycoplasma fermentans* e *Ureaplasma spp.*, e totalmente ineficaz contra *Mycoplasma hominis*. Além disso, as quinolonas são usadas nos tratamentos contra micoplasmas, agindo como bactericidas onde outros agentes antimicrobianos agem primariamente como bacteriostáticos (DUFFY *et al.*, 2000). Estudos comparativos realizados *in vitro*, sobre a atividade da gemifloxacina, uma nova fluoroquinolona, em relação a diversos antibióticos utilizados contra micoplasmas do trato respiratório e urogenital, demonstraram uma maior atividade desta substância em relação a ciprofloxacina.

Estudos têm descrito que certos pacientes com infecções micoplásmicas do trato urogenital causadas por *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*, quando em tratamento por 5 a 7 dias, algumas vezes apresentam recorrência (GELFAND, 1993). Devido à persistência destes microrganismos frente ao protocolo acima, tem sido mais indicada a terapia por 14 a 21 dias com a combinação de eritromicina e cloranfenicol (HANNAN & WOODNUTT, 2000).

Em 1969, KUNDSIN *et al.* relacionaram a infecção micoplásmica a quatro abortos espontâneos em cinco pacientes estudadas onde a cultura do material cervical foi positiva para micoplasmas. Em estudo comparativo, TYLER & SHAPIRO (1985), ao analisarem o mesmo número de pacientes, com histórico semelhante de abortos e nas quais a cultura do material cervical foi positiva somente para micoplasmas, demonstraram que o tratamento com antibióticos, principalmente no primeiro trimestre da gestação, conseguiu ser eficiente ao diminuir estes números para somente um em cinco casos.

#### **Detecção e diagnóstico:**

A infecção micoplásmica deve ser sempre considerada quando há suspeitas nas quais os micoplasmas podem desempenhar algum papel na doença e onde o isolamento e a identificação de outros microrganismos resultarem negativos (CASSEL *et al.*, 1997).

Estes microrganismos tão diminutos são muito exigentes quanto ao seu cultivo. As espécies *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma fermentans* e *Mycoplasma genitalium* possuem um crescimento muito fastidioso com uso de algumas vias bioquímicas, tornando o seu isolamento a partir de amostras clínicas uma tarefa difícil, sendo necessário muitas vezes a introdução de técnicas moleculares para a sua detecção. As técnicas disponíveis para a detecção e identificação dos micoplasmas, como o uso de sondas ou amplificação do DNA, assim como alguns métodos imunológicos e de cultivo com meios enriquecidos tem possibilitado minimizar este problema (CUNHA, 2001). Por outro lado, as espécies do gênero *Ureaplasma spp.* e a espécie *Mycoplasma hominis* são facilmente identificadas nos meios de cultura.

Assim, considerando os recentes dados da literatura, reportando a existência das espécies *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma*



*genitalium* e *Mycoplasma fermentans* em gestantes, estudos de prevalência destes microrganismos nestas pacientes e as possíveis conseqüências da contaminação materna sobre o desenvolvimento fetal se tornam importantes na compreensão do papel destes microrganismos nas infecções materno-fetais.

## Considerações gerais sobre as espécies de micoplasmas estudadas:

### *Mycoplasma hominis*

O isolamento de *Mycoplasma hominis*, em 1937, por DIENES & EDSALL, em abcesso da glândula de Bartolin, representou a primeira observação da associação entre os micoplasmas e o homem. Assim como em vários outros estudos, ELSHIBLY *et al.* (1996) acreditam que esta espécie é um agente transmitido sexualmente. Após seu primeiro isolamento, observou-se que *M. hominis* necessita de soro para o seu crescimento e possui semelhanças morfológicas e coloniais de “ovo frito”, peculiares aos demais micoplasmas. Estudos *in vitro* demonstraram que uma importante propriedade da espécie *Mycoplasma hominis* é sua capacidade de metabolizar arginina, com liberação de grande quantidade de amônia, resultando em intenso efeito citotóxico (MANILOFF *et al.*, 1992).

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

Este microrganismo também foi isolado no líquido amniótico e cérvix de gestantes que tiveram em seguida parto prematuro em porcentagens significativas, em relação àquelas com parto normal (CASSEL *et al.*, 1983). Segundo HAY *et al.* (1994), mulheres com vaginose bacteriana

possuem cinco vezes mais probabilidade de terem parto prematuro do que as não infectadas.

Atualmente *Mycoplasma hominis* tem seu papel na etiologia das vaginoses bacterianas bem esclarecido após ser detectado na vagina de dois terços ou mais de mulheres com sintomas, e em somente 10% de mulheres assintomáticas (TAYLOR-ROBINSON, 1996). *Mycoplasma hominis* também foi detectado no sangue de 10% das mulheres que tiveram febre puerperal ou febre pós parto, não tendo sido isolado em pacientes afebris com aborto ou em gestantes saudáveis (TAYLOR-ROBINSON, 1988). Além disso, sua responsabilidade como possível agente etiológico de infecções do trato respiratório em recém-nascidos foi comprovada, resultando em alguns casos, em meningites por infectar o sistema nervoso central (TAYLOR-ROBINSON, 1996a).

Existem também evidências do seu envolvimento em casos de doença pélvica inflamatória (PID), através do seu isolamento de 10% das pacientes com salpingite, diagnosticadas por laparoscopia (HENRY-SUCHET *et al.*, 1980). Pacientes com infecções invasivas por *M. hominis*, quase sem exceção, conseguem fazer soroconversão ou apresentar um significativo aumento no título de anticorpos. Esta resposta pode ser mensurada através de testes de inibição metabólica ou por ensaio imunoenzimático (ELISA) (BROWN *et al.*, 1987).

Entretanto, a sorologia tem suas limitações por ser um teste indireto e os testes de detecção do antígeno ou de seu genoma seria de grande interesse. A padronização de técnicas moleculares como a PCR e sua utilização no diagnóstico de *Mycoplasma hominis*, vem sendo crescente (RAZIN, 1998), proporcionando um grande avanço no diagnóstico de infecções invasivas causadas por este microrganismo. Tais técnicas possibilitam também um melhor entendimento sobre a sua susceptibilidade a antibióticos (TAYLOR-ROBINSON & FURR, 1986; WAITES *et al.*, 1991).

### ***Mycoplasma fermentans***

Desde seu isolamento original no trato urogenital humano em 1952 por RUITER & WENTHOLT, *Mycoplasma fermentans* não tem sido freqüentemente detectado neste sítio (STÄDTLANDER *et al.*, 1991). O isolamento de *Mycoplasma fermentans* a partir de amostras clínicas, em meios artificiais tem apresentado dificuldades (LO *et al.*, 1989). Porém, estudos sorológicos sugerem que anticorpos contra este microrganismo sejam comuns em adolescentes e crianças (TAYLOR-ROBINSON *et al.*, 1965), revelando sua presença como possível colonizador do trato geniturinário.

A possibilidade de *Mycoplasma fermentans* ser patogênico para o homem foi pouco considerada até a sua detecção em pacientes com AIDS, tendo sido a primeira espécie de micoplasma identificada como invasiva nestes indivíduos (LO *et al.*, 1989a). Porém, acredita-se que em condições de imunossupressão, este possa agir como um patógeno oportunista. E, através da PCR, *M. fermentans* tem sido detectado em amostras de lavado broncoalveolar de 25% de pacientes com AIDS que apresentavam pneumonia, o que não foi observado em pacientes HIV negativos (AINSWORTH *et al.*, 1994).

Em estudos posteriores, CASSEL *et al.* (1994) isolaram-no da traquéia de crianças com pneumonia, sendo em dois terços destas o único microrganismo presente. Foi detectado também em adultos com uma doença, semelhante à influenza, a qual, em alguns casos, chegou a evoluir para uma síndrome respiratória freqüentemente fatal (LO *et al.*, 1993).

FRANGOSO *et al.* (1992) atribuem ao *Mycoplasma fermentans* a capacidade de fusão com linfócitos do sangue periférico, sendo um processo que pode resultar da interação entre componentes da membrana deste micoplasma e dos linfócitos. Este microrganismo, bem como várias outras espécies de micoplasmas, têm a capacidade de induzir a liberação de TNF $\alpha$  e citocinas de células eucarióticas (CROUSE *et al.*, 1998), sugerindo que esta liberação, estimulada pelo ataque do micoplasma à superfície

destas células, produza um estado de hipoativação da célula hospedeira, provocando uma maior suscetibilidade à infecção (GALILY *et al.*, 1992).

Recentemente, *Mycoplasma fermentans* foi detectado através da PCR em articulações de cerca de 20% de pacientes com artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias, necessitando ser melhor investigado o seu papel nestas enfermidades (SCHAEVERBEKE *et al.*, 1996).

SHIBATA *et al.* (1999), também com o auxílio da PCR, conseguiram detectar *M. fermentans* na saliva de 110 (54,7%) entre 201 pacientes com idade entre quatro meses a cinquenta e nove anos, separados em grupos de recém nascidos, crianças, adolescentes e adultos. Destes pacientes, uma positividade significativa foi encontrada no grupo compreendido por crianças, com idade entre 4 meses a 3 anos, onde a frequência encontrada foi de 28,6% e no grupo dos adolescentes com idade de 7 a 12 anos foi de 31,0%. Contudo, os autores não confirmam porém uma correlação clínica entre estes achados e uma possível transmissão materno fetal, apenas levantando a questão.

*Mycoplasma fermentans* foi também detectado no fluido amniótico em quatro casos de cesariana dentre 232 mulheres estudadas com membrana intacta. Em três dos quatro casos foi possível a coleta do tecido placentário, sendo todos PCRs-positivos para o microrganismo. Em dois dos quatro casos havia vilosite e corioaminionite e não detectaram nenhum outro microrganismo, sugerindo que esta espécie deva ser objeto de novos estudos como causa de infecção materna e fetal (CASSEL *et al.*, 1997).

Outros estudos porém, demonstraram que este microrganismo não foi detectado em cultura e tampouco por PCR em amostras da uretra de 94 homens com uretrites e do colo uterino de 87 mulheres com cervicite (TRUM *et al.*, 2000). Em virtude de seu crescimento em meios de cultura ser extremamente difícil, ainda tem sido recomendada a utilização de técnicas como a PCR, a hibridização *in situ* ou a imunohistoquímica para melhor

estabelecer seu papel nas doenças humanas (LO *et al.*, 1989; BARBEYRAC *et al.*, 1993).

Todavia, até o momento não há evidências concretas de que *Mycoplasma fermentans* seja realmente agente etiológico de doenças no homem, sendo ainda necessário estabelecer melhor sua freqüência nos tratos urogenitais masculino e feminino, em casos sintomáticos e assintomáticos (DEGUCHI *et al.*, 1996). Da mesma forma seu possível papel patogênico também deve ser considerado e pesquisado durante a gestação, onde o sistema imunológico da mulher se encontra significativamente alterado, e quando sua detecção pode ter implicações significativas.

A falta de consenso quanto ao verdadeiro papel de *Mycoplasma fermentans* como agente etiológico nas doenças humanas, demonstra a complexidade do seu comportamento e torna necessário um maior número de estudos sobre o microrganismo.

### **Gênero *Ureaplasma spp.***

*Ureaplasma urealyticum*, é certamente a espécie com maior número de estudos relacionados com as doenças do trato de geniturinário. Seu primeiro isolamento ocorreu em 1954, quando SHEPARD identificou este microrganismo no trato urogenital masculino de pacientes com uretrites não gonocócicas recorrentes, sendo reconhecido seu papel nestas patologias (TAYLOR-ROBINSON & FURR, 1997).

A sua patogenicidade é relacionada à presença das enzimas urease, protease (KILIAN *et al.*, 1984), fosfolipases A e C e as proteínas da MBA (Múltipla Banda Antigênica) (ZENG *et al.*, 1995). Suas características coloniais são um pouco diferentes das demais espécies, já que metabolicamente apresentam a capacidade de hidrolisar a uréia e de não fermentar carboidratos (STYLER e SHAPIRO, 1985). Isto possibilita sua identificação pela cultura, como uma diminuta colônia de coloração marrom dourada, em virtude da hidrólise da uréia com dióxido de manganês do meio

sólido A<sub>7</sub> que precipita como monóxido de manganês (SHEPARD & LUNCEFORD, 1976) e cujos resultados têm demonstrado ser um teste 100% sensível na detecção de ureaplasmas (TRUM *et al.*, 2000). O efeito patogênico da urease é causado pela geração de amônia, enquanto sua capacidade de quebrar a molécula de imunoglobulina A se dá através de sua protease, o que pode dar aos ureaplasmas a capacidade de invadir o trato urogenital superior por degradar o principal componente do sistema imune da mucosa. As fosfolipases podem ser responsáveis por nascimentos prematuros por alterarem a biossíntese de prostaglandinas (GALSS *et al.*, 2000).

*Ureaplasma urealyticum* tem sido implicado em complicações da gestação, prematuridade e doenças infantis (KUNDISIN, 1996). Mas o exato significado deste microrganismo em doenças humanas é controverso, particularmente, em alguns relatos envolvendo a gestação. Como este microrganismo é considerado comensal no trato urogenital de mulheres sexualmente ativas (TENG *et al.*, 1994b), aparecendo em até 80% dos casos estudados (SÁNCHEZ *et al.*, 1987), sua função patogênica em casos individuais é complicada (KONG *et al.*, 1999). Entretanto, apesar de relatos da sua participação em alguns processos patológicos humanos, sua presença em indivíduos assintomáticos tem dificultado o estabelecimento de sua etiologia em várias doenças. Tal diversidade de comportamento deve-se eventualmente às diferenças genéticas ou ao número de microrganismos presentes (CUNHA *et al.*, 1997).

*Ureaplasma urealyticum* pode ser transmitido de uma mulher infectada para o feto, ainda no útero ou na hora do parto, pela sua passagem no canal colonizado (CASSEL *et al.*, 1995). O isolamento desta espécie em culturas do líquido amniótico e órgãos internos do feto com presença de funiculite e pneumonia (CASSEL *et al.*, 1983), e uma resposta específica de IgM (QUINN *et al.*, 1985), pode ser considerado como uma forte evidência de que a infecção fetal ocorra ainda no útero. CASSEL *et al.* (1988) encontraram uma positividade de 14% de *U. urealyticum* em amostras endotraqueais coletadas em recém-nascidos com baixo peso,

entre as primeiras 24 horas após o nascimento através de cesariana com membranas intactas, indicando que a transmissão uterina seja possível.

Outras complicações da gravidez causadas por *Ureaplasma urealyticum* são displasia broncopulmonar neonatal (ALFA *et al.*, 1995) e processo séptico, relatado por BRUS *et al.* (1991), onde a infecção pelo microrganismo poderia inclusive afetar o sistema nervoso central do recém-nascido, levando a meningite (HEGGIE *et al.*, 1994).

As espécies do gênero *Ureaplasma spp.* têm sido relacionadas a casos de infertilidade, ao serem detectadas em esperma humano, cujo mecanismo parece ser análogo ao pesquisado em ratos, onde este microrganismo causa um decréscimo na motilidade do esperma através do cérvix ao útero e dentro das trompas de Falópio (STYLER & SHAPIRO, 1985).

Estudos sobre a variação gênica da espécie *Ureaplasma urealyticum* através do gene da região 5' terminal da Múltipla Banda Antigênica (MBA), que é um antígeno reconhecido durante as infecções e um importante determinante de virulência, tem mostrado uma maior diversidade entre os sorotipos (ROBERTSON *et al.*, 1994), importante determinante de virulência deste gênero (KONG *et al.*, 1999), tendo culminado, com sua divisão em duas espécies distintas. Inicialmente, subdividem-no em dois biotipos constituídos respectivamente pelos sorogrupos: 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 (biotipo 1) e 1, 3, 6 e 14 (biotipo 2) (KONG *et al.*, 1999). Porém, estudos subsequentes classificam o gênero *Ureaplasma spp.* em duas espécies: *U. urealyticum* e *U. parvum*; sendo 3 subtipos de *U. urealyticum* identificado: subtipo 1 constituído pelos sorotipos: 2, 5, 8, e 9; subtipo 2 representado pelos sorotipos 4, 10, 12 e 13; e subtipo 3 pelos sorotipos 7 e 11. A segunda espécie, *U. parvum* foi representada pelos sorotipos 1, 3, 6 e 14 (KONG *et al.*, 2000).

Considerando que certas doenças têm sido atribuídas mais frequentemente à algumas sorovariedades do que a outras (ABELE-HORN *et al.*, 1997), vários métodos têm sido descritos para justificar estas diferenças, incluindo perfil enzimático (DAVIS & VILLANUEVA, 1990),



análise de proteínas e epítomos antigênicos (TENG *et al.*, 1994a), hibridização de DNA (CHRISTIANSEN *et al.*, 1981), gel de eletroforese uni e bi-dimensional (SWENSON *et al.*, 1983), amplificação através da PCR de genes específicos (BLANCHARD, 1990) , entre outros.

No entanto, a análise da associação entre cada sorotipo e as doenças tem sido difíceis devido às dificuldades práticas com a sorotipagem e pela pequena diferença genética entre os sorotipos. Apesar de terem demonstrado algumas reações cruzadas, recentes estudos sorológicos com uso de anticorpos monoclonais contra sorotipos do gênero *Ureaplasma spp.* também se mostraram promissores na possível identificação de alguns isolados clínicos, sendo mais uma estratégia para identificar o elo entre a expressão ou variabilidade do antígeno sorotipo-específico e sua patogenicidade (ECHAHIDI *et al.*, 2000).

Portanto, a distinção das espécies do gênero *Ureaplasma spp.* em amostras clínicas seria de grande interesse. Além disso, estudos sobre os biotipos e sorotipos podem levar a melhor correlação sobre sua patogenicidade, principalmente nos problemas da gestação e suas complicações para o feto.

### ***Mycoplasma genitalium***

*Mycoplasma genitalium* é habitualmente encontrado como um parasita em associação com o epitélio ciliado vaginal e respiratório (WASINGER *et al.*, 2000). Os primeiros estudos desta espécie se iniciaram com TULLY *et al.* em 1981, a partir do primeiro isolamento em raspados uretrais de dois entre 13 homens com sintomas de uretrites não gonocócicas. Apesar de tentativas subsequentes de novos isolamentos no homem não terem obtido sucesso, a inoculação intra-uretral desse microrganismo em primatas resultou em inflamação, sugerindo que ele poderia ser causa de uretrite (MOLLER *et al.*, 1984). Na década seguinte,

JENSEN *et al.* (1991), isolaram-no novamente de material cervical utilizando meios para micoplasmas e cultura em células como etapa intermediária.

O conhecimento de seus fatores de virulência, muitas vezes similares aos de *Mycoplasma pneumoniae*, sugere que este microrganismo também possa causar doenças respiratórias, levando a possíveis equívocos no diagnóstico quanto a etiologia dessas doenças (GÖHLMANN *et al.*, 2000). Segundo JACOBS (1993), em razão desta homologia, todos os casos positivos para estes micoplasmas detectados através de técnicas sorológicas, deveriam ser confirmados por *immunoblotting*, a fim de determinar a etiologia dos processos respiratório e urogenital.

Estudos sorológicos em humanos e estudos experimentais em primatas também indicam que *Mycoplasma genitalium* possa ser causa de PID (doença pélvica inflamatória) (TAYLOR-ROBINSON *et al.*, 1987). Segundo TEICHMAM *et al.* (1998), o microrganismo foi detectado em aproximadamente 40% das mulheres com PID. Alguns autores supõem que esta participação em doenças do trato genital superior possa ocorrer pela sua propriedade, demonstrada *in vitro*, de aderir às trompas de Falópio, além da detecção de variação significativa nos títulos de anticorpos anti- *M. genitalium* em um terço das mulheres com PID, sem constatação da presença de outros microrganismos (MOLLER *et al.*, 1984). Outros estudos sorológicos em humanos demonstraram um acréscimo de 4 vezes nos títulos de anticorpos em relação aos valores observados em estudo com fêmeas primatas (TULLY *et al.*, 1986).

Com o aparecimento da AIDS, *Mycoplasma genitalium* também foi investigado em pacientes portadores de HIV-1, onde os resultados mostraram uma positividade de 27,8% no TGU de aidéticos, 7% em portadores HIV assintomáticos e 10,4% em pacientes não infectados, valores considerados significativos para MARTINELLI *et al.* (1999).

Através do advento da PCR, TAYLOR-ROBINSON *et al.* (1995) detectaram esse microrganismo na uretra de aproximadamente 19-27% de homens com uretrites não gonocócicas (UNG) e no trato geniturinário de 7-20% de mulheres atendidas em clínica de doenças sexualmente

transmissíveis (DST) com uretrite ou cervicite. A grande importância da utilização da PCR está em permitir a detecção de DNA micoplásmico em material urogenital de pacientes soronegativos e com cultura negativa (BARBEYRAC *et al.*, 1993). Assim, a PCR possibilitou grandes avanços nos estudos de *Mycoplasma genitalium* como possível agente etiológico em doenças do TGU, doenças reumáticas e respiratórias entre outras (JENSEN *et al.*, 1991). Estudos moleculares experimentais envolvendo a inoculação desta espécie na vagina de fêmeas Balb/c tratadas com progesterona, puderam detectar quantidades equivalentes a  $10^{-15}$  g de DNA. Considerando-se que o seu genoma é de 578 Kb, equivalendo a  $10^{-16}$  g de DNA, sendo um dos menores sequenciados até o momento, este estudo atribui um grande poder de detecção da PCR ao possibilitar a detecção de 10 organismos (PALMER *et al.*, 1991). Segundo UNO *et al.* (1997), em estudo com mulheres japonesas, o microrganismo foi encontrado através da PCR em uma prevalência de 7,8% das pacientes com cervicites e 5,7% com adnexite.

O papel desse microrganismo não foi no entanto bem avaliado em infecções maternas e fetais, causando várias discussões. Não há portanto, informações detalhadas a respeito de todos os possíveis nichos ecológicos de *Mycoplasma genitalium*, havendo necessidade de mais pesquisas para avaliar o papel deste micoplasma em doenças relacionadas à gravidez e ao parto. Assim, os estudos futuros em humanos sobre seu papel nas doenças respiratórias de crianças e lactentes seriam de grande importância.

### ***Mycoplasma penetrans***

*Mycoplasma penetrans* foi isolado em 1991, de amostras de urina de 6 indivíduos com AIDS, não tendo sido encontrado em indivíduos HIV negativos (LO *et al.*, 1991a), tornando-se a partir dessa década um dos mais interessantes alvos de pesquisa de microbiologistas no mundo.

Estudos sobre as características desta espécie mostraram que é capaz de fermentar e oxidar a glicose, de hidrolisar arginina, é incapaz de hidrolisar uréia, requer colesterol para seu crescimento, é suscetível a digitonina e resistente à penicilina e aos sulfatiazóis, tem propriedade de reduzir sais de tetrazólio, hemadsorção, citoadsorção, formação de beta-hemólise e fraca alfa hemólise (LO *et al.*, 1992).

Sua denominação foi sugerida após autores demonstrarem seu poder de aderência e invasão de várias células de mamíferos (LO *et al.*, 1992). Em 1993, LO *et al.* observaram que *Mycoplasma penetrans* possui a característica de aderir a superfícies de frascos de plásticos ou de vidro, demonstrando mais uma vez sua característica de adesão. A capacidade de invadir células é um importante fator de virulência comum a vários microrganismos, mas que na classe *Mollicutes* havia sido até então observado somente na espécie *Mycoplasma fermentans* (LO *et al.*, 1989).

SALMAN *et al.* (1995) ao analisarem a membrana lipídica deste microrganismo, revelaram que mesmo com adição de grande quantidade de colesterol não esterificado ao meio de cultura, *Mycoplasma penetrans* incorpora fosfolipídeos exógenos, preferencialmente esfingomiéline, através da atividade da fosfolipase A1. Possivelmente, a função desta enzima pode estar relacionada à formação de mediadores para a interação deste microrganismo com as células eucarióticas.

Através de estudos de microscopia eletrônica sobre a superfície da cápsula polissacarídica e da fração glicolípida, ficou demonstrado que a identificação desta cápsula na espécie *Mycoplasma penetrans* é particularmente interessante nos micoplasmas, a qual tem sido relacionada à sua aderência a célula hospedeira e sua invasão aos compartimentos intracelulares, podendo ter significado na patogenia das doenças associadas com infecção por estes microrganismos (NEYROLLES *et al.*, 1998).

Ao se isolar e caracterizar as nucleases de *M. penetrans*, foi observado que estas enzimas são capazes de reduzir a atividade da transcriptase reversa do HIV e também demonstraram uma grande atividade

---

sobre outros substratos, como DNA e RNA de células eucarióticas (GIRÓN *et al.*, 1996). Em 1997, BENDJENNAT *et al.* sugeriram que as nucleases ativadas, associadas com as proteínas de 50 e 40 kD do micoplasma, estão implicadas essencialmente na aquisição de precursores de ácido nucleicos mais do que na reserva destas enzimas obtida do DNA hospedeiro ou no reparo e recombinação do DNA micoplásmico. Estas características podem ser observadas como um potencial fator de patogenicidade em vários microrganismos, e em particular para os micoplasmas, que possuem a capacidade de invadir células eucarióticas. Porém, em estudos anteriores, *Mycoplasma penetrans* foi capaz de induzir a produção de TNF $\alpha$  e aumentar a replicação do HIV em células pró-monocíticas não ativadas/ monoblastos infectadas, como observado em outros micoplasmas (IYAMA *et al.*, 1996). Esta contradição entre seus estudos pode depender do experimento realizado, além de considerar o que ocorre “*in vivo*” com esta espécie.

Em pacientes HIV negativos, esta espécie foi detectada no sangue e orofaringe de pacientes com uma síndrome rara, denominada Síndrome Antifosfolípídica Primária (YANEZ *et al.*, 1999). Entretanto, *M. penetrans* parece estar sorologicamente mais associado a pacientes HIV positivos. SASAKI *et al.* (1994) relataram que este microrganismo tem propriedade de induzir, *in vitro*, uma resposta proliferativa de células T CD4 e CD8, com expressão de alguns marcadores de ativação, como CD69, HLA-DR e CD25, tanto em células de indivíduos HIV- positivos em vários estados da doença, quanto em HIV-negativos. Isto pode ser importante pelo fato de que o HIV só se replica completamente em células ativadas (MONTAGNIER & BLANCHARD, 1993).

Algumas proteínas extraídas de *Mycoplasma penetrans*: lipoproteínas de 35, 38, 61 e 103 kD são descritas como imunoreativas em indivíduos sorologicamente positivo para HIV, mas não em pessoas HIV negativos. Contudo, a função destas proteínas não foi ainda descrita (TULLY *et al.*, 1995). A determinação da prevalência de anticorpos específicos nestes indivíduos, por ELISA, com uso de lipoproteínas de sua membrana (LAMP) está em torno de 20% para pacientes HIV positivos; 40% para

pacientes com AIDS contra uma prevalência de 0.3% em pacientes HIV negativos (WANG *et al.*, 1992). Portanto, a maioria das investigações enfocam seu papel como possível co-fator da AIDS, sendo pouco explorado o seu envolvimento com as alterações relacionadas às gestantes.

Como descrito anteriormente, pouco se conhece sobre o efeito da colonização dos diferentes micoplasmas na gestação pela própria detecção ter ocorrido em outras condições clínicas. No entanto, as recentes descobertas sobre as propriedades metabólicas, adesinas e enzimas levam a sugerir que a alta taxa de isolamento ou identificação nos casos de insucessos na gestação não seja uma mera coincidência.

Por estas razões, a proposta deste trabalho foi a detecção de *M. penetrans*, assim como as outras espécies de maior relevância no trato urogenital, como *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *U. parvum* e *U. urealyticum*. Para isso, foi realizado o cultivo e o emprego de técnicas moleculares em material colhido do fundo de saco de Douglas de gestantes. Em virtude da sua natural alteração fisiológica na gravidez pode haver intensa colonização microbiana, dificultando uma avaliação real dos isolados pelo cultivo, por isso este sítio foi escolhido devido ao pH ser um pouco mais elevado e pelo menor potencial de óxido-redução local em relação ao do fluxo vaginal, facilitando a colonização. Além disso, por se tratar de agentes pouco investigados, mas aparentemente prevalentes na nossa população, a abordagem abrangente sobre as diferentes espécies de micoplasmas pode ser útil como um trabalho de revisão destes possíveis agentes patogênicos, abrindo caminho para futuros estudos sobre correlações dos dados clínicos das pacientes clínicas na nossa população.

## **OBJETIVOS**

---

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- OBJETIVO GERAL:**

Este trabalho teve como objetivo investigar a prevalência das espécies: *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma fermentans* e *Mycoplasma genitalium*, e das espécies mais frequentemente associadas com as alterações do trato geniturinário: *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* e *Mycoplasma hominis*, em material cervical de gestantes.

### **2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1) Identificar as espécies de micoplasmas segundo metodologias padronizadas de cultivo e da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em gestantes;
- 2) Quantificar os isolados de *Ureaplasma spp* e *Mycoplasma hominis* através da técnica de microtitulação;
- 3) Classificar, através da reação em cadeia pela polimerase (PCR), as amostras positivas para *Ureaplasma spp* em *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*, segundo os algoritmos de identificação dos biotipos, sorotipos e subtipos;
- 4) Determinar a presença do plasmídeo "tetM" nas amostras positivas para micoplasmas através da PCR.



## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

---

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1- AMOSTRAGEM**

As amostras clínicas foram obtidas de 117 mulheres grávidas com queixas clínicas de infecções do trato geniturinário, em várias idades gestacionais, atendidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo. Todas as pacientes foram esclarecidas sobre a finalidade do estudo e concordaram com o exame através da assinatura do termo de consentimento pós informado (Processo Comissão de Ética 053/99) (Anexo 1). As amostras foram posteriormente encaminhadas para processamento no Laboratório Micoplasmologia da Disciplina de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

##### **3.1.1- Material Clínico**

O material clínico consistiu de swab constituído de células colhidas do fundo de saco de Douglas, com auxílio de swab alginatado neutro e transportado em meio de transporte A3xb (SHEPARD, 1976, mod.).

O esquema a seguir ilustra o fluxograma utilizado no processamento do material clínico.



Material colhido do Fundo do Saco de Douglas

Meio de transporte A3xb

⊕ Cultivo 37°C em condições especiais a cada espécie até 21 dias

Biologia Molecular

Extração do DNA

alíquota armazenada a -80° C

Microtitulação (Casos +)

PCR

Controles internos

gene globina

Plasmídeo pBR<sub>322</sub>

Meio sólido A7

Meio líquido Arginina

Meio líquido U10

Meio líquido Glicose

Meio líquido SP-4

Meio sólido SP-4

PCR Genérico

PCR *M. penetrans*

PCR *M. genitalium*

PCR *M. fermentans*

PCR *M. hominis*

PCR *Ureaplasma spp*

Análise da especificidade dos fragmentos amplificados c/ enzimas de restrições específicas

Det. biotipos

Det. Sorotipos: *U. parvum*

Det. Subtipos: *U. urealyticum*

Fluxograma do processamento das amostras coletadas

### **3.2- CULTURA DOS MICOPLASMAS**

Como controles positivos foram utilizadas as cepas padrão: *M. hominis* (ATCC 23114), *M. fermentans* (ATCC 19989), *M. genitalium* (ATCC 33530), *M. penetrans* (ATCC GTU-546A1), *U. urealyticum* (sorotipo V-ATCC 27817), *U. urealyticum* (sorotipo X-ATCC 33699), *U. parvum* (sorotipo III-ATCC 27815).

#### **3.2.1- Meios de Cultura**

Na coleta, isolamento e identificação dos micoplasmas utilizamos os meios de cultura padronizados conforme descrito no Anexo 02, onde a partir de dois tubos contendo 3 mL de meio de transporte em cada, aproximadamente 2 mL foram destinados ao cultivo, 1 mL à PCR e o restante conservado a -80° C.

#### **3.2.2- Semeadura**

Para o isolamento dos micoplasmas a partir das amostras clínicas de cada paciente, o conteúdo dos dois tubos contendo meio de transporte A3xb (SHEPARD, 1976, mod.) foram homogeneizados e distribuídos em alíquotas de 0,1 mL, semeadas em meios sólidos A7 (SHEPARD 1976, mod.) e SP-4 (TAYLOR ROBINSON 1996b, mod. ). Uma alíquota de 0,5 mL de cada tubo foi inoculado em 2,0 mL dos meios de cultura líquidos: U10 (SHEPARD 1974, mod), Arginina (VELLECA 1979, mod.), SP-4 e Glicose (ALUOTTO 1970), resultando em diluições iniciais de 1:5, a partir da qual foram realizadas as sucessivas diluições: 1:50, 1:500, através da pipetagem de 0,2 mL destes tubos para o outro tubo com 1,8 mL de meio, e assim mais uma vez nos respectivos tubos contendo os meios de cultura líquidos. Estas diluições objetivaram diminuir a concentração de

possíveis inibidores do crescimento dos micoplasmas que poderiam estar presentes (TAYLOR-ROBINSON, 1996a), os quais dificultariam a detecção das espécies mais fastidiosas como: *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma penetrans*.

As amostras clínicas assim processadas foram incubadas: para identificação de *Mycoplasma penetrans* a 37°C em condições de aerobiose em meio SP-4; para identificação de *Mycoplasma fermentans* em anaerobiose no meio glicose utilizando o gerador de anaerobiose AnaeroBAC (PROBAC, São Paulo, Brasil); para identificação de *Ureaplasma spp.* em microaerofilia 2-3% de CO<sub>2</sub> para o meio U10; para identificação de *Mycoplasma genitalium* em microaerofilia 2-3% de CO<sub>2</sub> para o meio glicose e por fim para identificação de *Mycoplasma hominis* também incubou-se em microaerofilia 2-3% o meio arginina.

### 3.2.3- Identificação dos isolados

O crescimento dos micoplasmas foi observado nos meios A7, U10, arginina, glicose e SP-4 por períodos que compreenderam de 1 a 21 dias.

Através do meio sólido A7 foi possível visualizar as colônias características de *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma spp.*, enquanto que os meios líquidos possibilitaram a observação da utilização de cada substrato específico. Nestes meios o crescimento destes microrganismos pode ser evidenciado através da alteração da cor do meio, ocorrida no ponto de viragem do indicador vermelho de fenol.

No meio A7, as cepas de *Ureaplasma spp.* foram distinguidas pela sua morfologia colonial típica, apresentando coloração marrom-dourada. Sua identificação também ocorreu pela observação da alcalinização do pH do meio líquido U10, em virtude da ação enzimática da urease sobre a uréia, um dos constituintes do meio, degradando-a em amônia e CO<sub>2</sub> (Taylor-Robinson, 1996b).

Por outro lado, no meio A7, o aparecimento de colônias com aspecto de “ovo frito” foram reconhecidas como sendo de *Mycoplasma spp.*. E, nos meios líquidos de Arginina, Glicose e SP-4 foi observado alteração na cor, em virtude da utilização dos substratos (arginina e glicose) pelos microrganismos em suas vias metabólicas.

### **3.2.4- Identificação sorológica de *Mycoplasma hominis* isolados das amostras clínicas pela técnica de OUCHTERLONY**

Com o intuito de identificar as colônias de *Mycoplasma spp.* como sendo *Mycoplasma hominis*, foi realizado a identificação sorológica através da técnica de imunodifusão dupla em ágar (OUCHTERLONY) utilizando-se anti-soro policlonal anti-*Mycoplasma hominis* obtido através da imunização em coelho para a caracterização imunológica da espécie *Mycoplasma hominis* (LEMCKE, 1965; OUCHTERLONY, 1949).

O procedimento utilizado para obtenção do antígeno solúvel isolado das amostras clínicas, foi realizado através da técnica de congelamento e descongelamento da suspensão de uma alíquota de 0.5mL do meio de cultura arginina com cultivo de *M. hominis*. O congelamento foi realizado mergulhando o antígeno em nitrogênio líquido e o descongelamento foi feito colocando-se os tubos imediatamente em banho-maria à 37°C. Este procedimento foi realizado somente uma vez, já que em virtude de não possuir parede celular, os micoplasmas são sensíveis a este choque térmico, ocorrendo assim o rompimento total das células.

Na metodologia empregada para a realização da imunodifusão dupla de Ouchterlony foram utilizadas lâminas de vidro de 2,5 x 7,5 cm, revestidas com ágar contendo 7 cavidades dispostas em círculo, sendo um orifício central e os demais distribuídos simetricamente ao redor. No orifício central foi colocado o soro anti-*Mycoplasma hominis* e nas demais cavidades

foram intercalados um antígeno padrão com os antígenos das amostras clínicas.

Foi utilizado como controle positivo uma cepa padrão de *Mycoplasma hominis* (ATCC 23114) lisada e os soros policlonais anti-*Mycoplasma hominis* foram obtidos através da imunização em coelhos.

A identidade antigênica entre o micoplasma padrão e os provenientes das amostras clínicas em presença do soro anti-*Mycoplasma hominis* foi observada através da formação de uma linha contínua circular de precipitação. Estas linhas de imunoprecipitação foram coradas através da solução de negro de amido 0,5%.

### 3.2.5- Quantificação dos isolados

A quantificação das espécies positivas de *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma hominis* nas amostras cultivadas foi realizada através da técnica de microtitulação, segundo padronização de TAYLOR-ROBINSON, (1996b) de acordo com o que segue: em uma placa de microtitulação (LiNBRO, Flow Laboratories, Inc., McLean, USA) com 96 cavidades contendo 270  $\mu$ L de meios líquidos U10 e Arginina para *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma hominis*, respectivamente, foram inoculados na primeira cavidade 30  $\mu$ L das amostras clínicas que haviam sido mantidas no meio de transporte A3xb. A seguir, procedeu-se a sucessivas diluições de razão 10. O número de microrganismos presentes na amostra foi expresso pela CCU (Color Changing Units) por mL, representado pelo inverso da maior diluição do microrganismo com observação de mudança da cor do indicador do meio de cultura em até 48 horas.

### **3.3-TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) PARA IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS**

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

#### **3.3.1- REAGENTES E MATERIAIS**

- ◆ Taq DNA polimerase, padrão de peso molecular  $\phi$ X 174 DNA/HaeIII Fragments, Tris-HCl base, EDTA, Azul de bromofenol, Brometo de Etídio (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suécia);
  - ◆ Triton X-100 (SERVA, Feinbiochemical GmbH & Co., Germany);
  - ◆ Ácido Bórico, Proteinase K 12 mg/mL, Agarose, Gel Loading Solution (SIGMA-Aldrich, Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
  - ◆ Padrão de peso molecular 100 pb DNA Ladder, Fenol saturado com Tris, "primers", dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), enzimas de restrição (GIBCO-Life Technologies, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, EUA);
  - ◆ Clorofórmio, Álcool isoamílico, Acetato de sódio, Etanol Absoluto, Glicerol (MERCK, KgaA, Darmstadt, Germany).
  - ◆ Tubos de microcentrífuga do tipo Eppendorf 0,2; 0,5; 1,7; 2,0 mL (Axygen Scientific (CIENCOR, São Paulo, Brasil);
  - ◆ Ponteiras de 0,5 a 10  $\mu$ L; 10 a 200  $\mu$ L e 100 a 1000  $\mu$ L (Uniscience do Brasil, São Paulo, Brasil).
-



### **3.3.2- EQUIPAMENTOS**

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

### **3.3.3- PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS PARA REALIZAÇÃO DA PCR**

#### **3.3.3.1- Extração do DNA micoplásmico**

Com a finalidade de extrair o DNA micoplásmico para realização da PCR, aproximadamente 1 mL das amostras clínicas, mantidas inicialmente em meio de transporte A3xb, foi empregado o método com fenol/clorofórmio. Inicialmente, estas foram centrifugadas por 15 minutos a 20.000 g, e o sedimento foi ressuscitado em 0,5 mL de tampão de lise (EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 0,1%, Proteinase K 200 µg/ mL, pH 8.0). A seguir, foram incubadas a 56°C por 60 minutos, seguido de fervura a 100°C por 10 minutos para inativação da Proteinase K, seguida da adição de 0,5 mL de fenol tamponado com Tris-HCl, submetendo-se esta mistura à homogeneização em agitador (Vórtex), com posterior centrifugação

a 2.500 g por 5 minutos, com o objetivo de remover as proteínas e restos celulares. Desprezada a fase orgânica, foram adicionados 0,5 mL da mistura de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico na proporção 25:24:1, também para a eliminação dos resíduos de proteínas. Novamente, a mistura foi emulsificada e centrifugada como anteriormente, e a fase aquosa transferida para um novo tubo de microcentrifuga ao qual adicionou-se 1,0 mL de etanol absoluto gelado e 50  $\mu$ L de acetato de sódio 3M. Após a homogeneização, as amostras foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por um período mínimo de 1 hora para precipitação do DNA. A seguir, foi realizada uma centrifugação a 13.000 g por 30 minutos, e o sedimento lavado com 1 mL de etanol a 70%. Nesta fase, retirou-se o máximo do sobrenadante e os tubos permaneceram à temperatura ambiente para a total evaporação do álcool remanescente. Ao final, ressuspendeu-se o DNA em 100  $\mu$ L de tampão TE (EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, pH 8.0) (BARBEYRAC, 1996).

### **3.3.3.2- Protocolo básico para realização da PCR multiplex para micoplasma genérico, gene da globina e DNA plasmidial pBR<sub>322</sub>**

A preparação das amostras foi realizada adicionando-se: 0,4  $\mu$ L de dNTP (solução de nucleotídeos, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD USA) (25 mM cada base dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 5  $\mu$ L Tampão Taq DNA polimerase 10X concentrado (500 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub> e 100 mM Tris-HCl) (Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden); 1  $\mu$ L "PRIMER" 1 (volume de uso para cada espécie); 1  $\mu$ L "PRIMER" 2 (volume de uso para cada espécie); 1 U (0,2  $\mu$ L) *Taq polimerase*; água ultra pura, grau reagente I (Milli-Q®) qsp 40  $\mu$ L (Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden) e 10  $\mu$ L amostra: DNA extraído.

Cada uma das amostras analisadas foi feita sem diluição e diluídas a 1:10 em água Milli-Q. Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50  $\mu$ L, segundo a padronização de VAN KUPPEVELD (1992).

A etapa de amplificação do DNA compreendeu uma desnaturação inicial por 15 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C; 1 minuto e 30 segundos a 58°C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C. Ao final, ocorreu uma extensão de 10 minutos a 72°C e as amostras foram conservadas a 4° C. A amplificação das amostras foi realizada no aparelho termociclador automático- Gene Amp 2400.

Após a amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% (tampão TBE 1x e 3 µL de brometo de etídio de uma solução mãe 10 mg/mL), onde foi utilizado o tampão de azul de bromofenol a 4% para a diluição das amostras a serem aplicadas. Para os PCR genéricos foi utilizado um controle positivo para a classe *Mollicutes*, sendo usado como marcador de peso molecular o 100 pb Ladder. A visualização das bandas foi realizada em transiluminador sob luz U.V..

### 3.3.3.2a- DNA micoplásmico

Dez microlitros de todas as amostras de DNA sem diluição e diluídas 1:10 em água MilliQ® estéril, com resultado positivo ou negativo das culturas, foram testadas para PCR quanto à detecção de todos os micoplasmas, com um par de “*primers*” genéricos, MGSO e GPO1 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), em uma concentração de uso de 40 µM (DUSSURGET *et al.*, 1994).

Os “*primers*” MGSO e GPO1 permitem amplificar um fragmento de 717 pb da região que codifica a porção 16S do rRNA (DUSSURGET *et al.*, 1994). A seqüência segue abaixo:

“*primer*” *sense*: 5' -'TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC- 3'

“*primer*” *anti-sense*: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCCGTA-3'

### 3.3.3.2b- Gene da globina

Foi utilizado como controle interno para verificar a eficácia do método de extração do DNA das amostras a detecção do gene da globina, com seu respectivo par de "primers", GLR1 e GLR2 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), em uma concentração de uso de 40  $\mu$ M (BAUER, 1991) (Anexo 03).

Os "primers" GLR1 e GLR2 amplificam um fragmento de 141 pb (BAUER, 1991). Os "primers" utilizados para o gene da globina foram:

"primer" sense: 5' -CAACTTCATCCACGTTCCACC- 3'

"primer" anti-sense: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'

### 3.3.3.2c- DNA plasmidial pBR<sub>322</sub>

A detecção do DNA plasmidial, para as amostras com cultura positiva e com PCR Multiplex negativo (gene da globina negativo) também foi realizada, afim de se verificar a presença de possíveis inibidores da reação na amostra. Para tanto, utilizou-se os "primers" abaixo:

"primer" sense: 5'-CATCTCGGGCAGCGTTGGGT -3'

"primer" anti-sense: 5'-AGCGACGCGAGTCAGTGAGC-3'

Como controle interno da reação utilizou-se o DNA pBr<sub>322</sub> (SIGMA CHEM. Co., St. LOUIS, MO, USA), adicionando-se 2 fg deste ao seu respectivo par de "primers", em uma concentração de 40  $\mu$ M (ABIVEN, 1992). Para amplificar um fragmento de 965 pb (Anexo 03).

### **3.3.4- PCR ESPECÍFICO PARA ESPÉCIES DE MICOPLASMAS**

As amostras positivas na PCR multiplex foram submetidas a PCR com “primers” específicos das espécies *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis*. Para *Ureaplasma spp.* foi realizado a sua identificação através de um protocolo especial, envolvendo a determinação dos biotipos com sorotipos e subtipos das duas espécies: *U. parvum* e *U. urealyticum*, respectivamente (item 3.9).

Para identificação dos micoplasmas por PCR, utilizou-se protocolos onde 10 µL de DNA extraído sem diluição e diluídas 1:10 em um volume final de 50 µL, foram amplificados com pares de “primers”, concentrações e tamanho de fragmentos amplificados da região que codifica a porção 16S do rRNA, específicos para cada espécie, conforme Tabela I e II.

A maioria das etapas de amplificação dos DNAs compreenderam uma desnaturação inicial por 15 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C; 1 minuto e 30 segundos a 58°C, 1 minuto e 30 segundos a 72°C e por fim, uma extensão de 10 minutos a 72°C, sendo submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para *M. fermentans* e *M. hominis* foram realizadas PCR com 2 pares de “primers” para confirmar a presença destas espécies nas amostras, em virtude do aparecimento de um fragmento amplificado inespecífico com os primeiros “primers”. Assim, em exceção ao protocolo de amplificação anterior, para o segundo par de “primer” de *M. fermentans*, a amplificação do DNA ocorreu com uma desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos com 94°C por 35 segundos, 55° C por 45 segundos e 72°C por 50 segundos para amplificação, pareamento e extensão, respectivamente e um tempo de “annealing” de 5 minutos a 55°C com uma extensão final a 72°C por 5 minutos adicionados ao final dos 45 ciclos. E, para o outro par de “primers” de *M.hominis*, foi realizado 40 ciclos de desnaturação a 95°C por

25 segundos, pareamento a 62°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.

**Tabela 1:** Descrição dos pares de “primers” (denominação e seqüência) utilizados na PCR específica para identificação de *M. penetrans*, *M. genitalium*, *M. hominis* e *M. fermentans*.

MICOPLASMA	Par	de Sequência de “primers”
		“primers”
<i>M. penetrans</i>	572	5'- CATGCAAGTCGGACGAAGCA -3'
	573	5'- AGCATTTCCTCTTCTTACAA -3'
<i>M. genitalium</i>	GN 1	5'- GAATGACTCTAGCAGGCAATGGCTG -3'
	GN 2	5'- ATTTGCCTTTTACAAGTTGGCT -3'
<i>M. hominis</i> (“primer” 1)	HOM 1	5'- TGAAAGGCGCTGTAAGGCGC -3'
	UNI	5'- TAATCCTGTTTGCTCCCCAC -3'
<i>M. hominis</i> (“primer” 2)	RNA H1	5'- CAATGGCTAATGCCGGATACGC -3'
	RNA H2	5'- GGTACCGTCAGTCTGCAAT -3'
<i>M. fermentans</i> (“primer” 1)	MF 1	5'- AAGAAGCGTTTCTTCGCTGG -3'
	UNI	5'- TAATCCTGTTTGCTCCCCAC -3'
<i>M. fermentans</i> (“primer” 2)	RW004	5'- GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC -3'
	RW005	5'- GGTTATTGATTCTAAATCGCCT -3'

**Tabela II:** Descrição dos pares de “primers” (concentração, produto amplificado e referência bibliográfica) utilizados na PCR específica para identificação de *M. penetrans*, *M. genitalium*, *M. hominis* e *M. fermentans*.

MICOPLASMA	Concentração do “primer” ( $\mu$ M)	Produto Amplificado (pb)	Referência
<i>M. penetrans</i>	40	410	GRAU <i>et al.</i> , 1994
<i>M. genitalium</i>	30	809	VAN KUPPEVELD <i>et al.</i> , 1992
<i>M. hominis</i> (“primer” 1)	30	589	DUSSERGET <i>et al.</i> , 1994
<i>M. hominis</i> (“primer” 2)	40	334	BLANCHARD <i>et al.</i> , 1993
<i>M. fermentans</i> (“primer” 1)	40	588	DUSSERGET <i>et al.</i> , 1994
<i>M. fermentans</i> (“primer” 2)	50	206	DITTY <i>et al.</i> , 1999

### 3.3.5-ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DAS REGIÕES AMPLIFICADAS ATRAVÉS DA PCR PARA MICOPLASMAS

A análise da especificidade dos fragmentos amplificados através das PCRs, para a identificação das espécies de micoplasmas pesquisadas, foi verificada através do uso de enzimas de restrição específicas, relacionado na tabela III:

**Tabela III:** Enzimas de restrição e condições empregadas na verificação da especificidade dos fragmentos amplificados pela PCR específica para cada espécie de micoplasma.

Micoplasma	Par de "primers"	Enzima de restrição	Concentração da enzima	Produto (pb)	Temperatura e hora de incubação
<i>M. penetrans</i>	572/ 573	<i>Ava</i> II	1 U	269 e 141	1h/ 37°C
<i>M. genitalium</i>	GN 1/ GN2	<i>Xba</i> I	1 U	608 e 201	1h/ 37°C
<i>M. hominis</i> ("primer" 1)	HOM 1/ UNI	<i>Kpn</i> I	1 U	299 e 290	1h/ 37°C
<i>M. hominis</i> ("primer" 2)	RNA H1/ RNA H2	<i>Hind</i> III	1,5 U	228 e 106	1 h/56°C
<i>M. fermentans</i> ("primer" 1)	MF1/UNI	<i>Ava</i> II	2 U	376 e 212	1h/ 37°C
<i>M. fermentans</i> ("primer" 2)	RW 004/ RW 005	<i>Dra</i> I	1,5 U	126 e 80	2h/ 37°C



◆ ***Mycoplasma penetrans***

As amostras positivas para a amplificação do fragmento de 410 pb, foram testadas quanto a especificidade pelo padrão de restrição por digestão do produto amplificado com a enzima endonuclease *Avall*, resultando fragmentos de 269 pb e 141 pb. A técnica consistiu em digerir 25  $\mu$ L do produto amplificado com 1 U de *Avall* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0,4  $\mu$ L de tampão REACT2<sup>®</sup> 10x concentrado (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) em 50  $\mu$ L de volume final da reação por 1 hora a 37°C. Após, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e a visualização dos produtos de digestão ocorreu em transiluminador U.V..

◆ ***Mycoplasma genitalium***

A especificidade pelo padrão de restrição por digestão do produto amplificado com a enzima endonuclease *Xbal* foi testada nas amostras positivas para a amplificação deste fragmento de 809 pb, resultando fragmentos de 608 pb e 201 pb. Esta análise consistiu na digestão por 1 hora a 37°C de 20  $\mu$ L do produto amplificado com 1 U de *Xbal* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0,4  $\mu$ L de tampão REACT2<sup>®</sup> 10x concentrado (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) em 40  $\mu$ L de volume final da reação. Ao final foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio, sendo a visualização dos produtos desta digestão obtida em transiluminador U.V..

#### ◆ *Mycoplasma fermentans*

No primeiro par de "primer", as amostras positivas para a amplificação do fragmento de 588 pb, foram testadas quanto à especificidade pelo padrão de restrição por digestão do produto amplificado com a enzima endonuclease *Avall*, resultando fragmentos de 212 pb e 376 pb. A técnica consistiu em digerir 20 µL do produto amplificado com 2 U de *Avall* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0,4 µL de tampão REACT2® 10x concentrado (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) em 40 µL de volume final da reação por 1 hora a 37°C. Estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e a visualização dos produtos de digestão ocorreu em transiluminador U.V.

No segundo par de "primer", as amostras positivas que resultaram na amplificação do fragmento de 206 pb, foram testadas quanto a especificidade pelo padrão de restrição por digestão do produto amplificado com a enzima endonuclease *DraI*, resultando em fragmentos de 126 pb e 80 pb. A técnica consisti em digerir por 2 horas a 37°C, 10 µL do produto amplificado com 1,5 U de *DraI* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 2 µL de tampão REACT2® 10x concentrado (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) em 20 µL de volume final da reação. Estes serão submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corado com brometo de etídio e a visualização dos produtos de digestão ocorreu em transiluminador U.V.

#### ◆ *Mycoplasma hominis*

Todas as amostras positivas resultantes do primeiro par de "primer" que amplificaram o fragmento de 589 pb, foram avaliadas quanto a especificidade através do padrão de restrição pela digestão do produto amplificado com a enzima endonuclease *KpnI*, resultando em fragmentos de

299 pb e 290 pb. Nesta técnica, 25 µL do produto amplificado foi submetido a digestão por 1 hora a 37°C com 1 U de *KpnI* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0,4 µL de tampão REACT<sup>®</sup>4 10x concentrado (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) em 50 µL de volume final da reação. Os produtos desta digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e através do transiluminador U.V. ocorreu a visualização dos produtos de digestão.

Para o segundo par de “*primer*”, as amostras positivas para a amplificação do fragmento de 334 pb, foram testadas quanto à especificidade por digestão do produto amplificado com a enzima endonuclease *HindIII*, obtendo-se fragmentos de 228 pb e 106 pb. A digestão ocorreu em 20 µL de volume final da reação, sendo que 10 µL do produto amplificado foi digerido com 1U de *HindIII* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0,4 µL de tampão 10x REACT<sup>®</sup>2 concentrado (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA). Estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. A visualização dos produtos de digestão foi feita em transiluminador U.V.

### 3.3.6- Identificação do gênero *Ureaplasma spp.*

A detecção de *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* nas amostras positivas para PCR genérico foi realizada segundo o protocolo estabelecido por KONG *et al.*, 1999 e 2000 (Anexo 04). Estes protocolos da PCR amplificam a região 5' terminal do gene da Múltiplas Bandas Antigênicas (MBA). Os “*primers*” utilizados nas etapas de identificação dos biotipos, sorotipos e subtipos foram os seguintes:

**\* Identificação das espécies do gênero *Ureaplasma* spp.**

*sense* UMS 125: 5'- GTATTTGCAATCTTTATATGTTTTTCG -3'

*anti-sense* UMA 226: 5'- CAGCTGATGTAAGTGCAGCATTAAATTC -3'

**\* Identificação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum* utilizando oligonucleotídeos específicos**

*sense* UMS 125: 5'- GTATTTGCAATCTTTATATGTTTTTCG -3'

*anti-sense* UMS 269 (serovar 3/14): 5'- CTAATGACCTTTTTCAAGTGTAC -3'

*sense* UMS 54 (serovar 6): 5'- CTTAGTGTTTCATATTTTTACTAG -3'

*anti-sense* UMS 269' (serovars 1- 6): 5'-CCAAATGACCTTTTGTAAGTACTAGAT-3'

**\* Identificação dos subtipos de *Ureaplasma urealyticum* utilizando oligonucleotídeos específicos**

*sense* UMS 61: 5'- TTTGCAAACACTATAAATAGACAC -3'

*anti-sense* UMA 219: 5'- GTAATTGCAACATGGAATTCAGCTTCG -3'

*anti-sense* UMA 219': 5'- GTAATTGCAACATGGAATTCAGCTTCA -3'

*sense* UMS 112: 5'- GATTAAACAAAATCTTAATGTTGTTA -3'

*anti-sense* UMA 194: 5'- CGTTTAATGCTTTTTTATCATTTCAG -3'

*sense* UMS 112': 5'- GATTAAACAAAATCTTAATGTTGTTG -3'

*anti-sense* UMA 194': 5'- CGTTTAATGCTTTTTTATCATTTCAT -3'

Na primeira etapa da PCR foi utilizado os "primers" UMS-125/UMA-226 que amplificam fragmentos de 448 e 403/404 pb das espécies *U. urealyticum* e *U. parvum*, respectivamente.

Na segunda etapa, separada a espécie *U. parvum*, fez-se algumas ampliações com a seqüência de oligonucleotídeos específicos dos sorotipos 1, 6 e 3/14, resultando em fragmentos amplificados com 442,443 pb e 442 pb, respectivamente (KONG, *et al.*, 1999). O marcador de peso molecular utilizado foi o  $\phi$ x 174 DNA/*Hae*III (Amershan Pharmacia).

Na terceira etapa, *U. urealyticum* foi identificado através da seqüência de oligonucleotídeos subtipos-específicos. Subtipo 1 consistiu das sorotipos 2, 5, 8, e 9; subtipo 2 contém sorotipos 4, 10, 12 e 13; e subtipo 3 contém sorotipos 7, e 11 (KONG, *et al.*, 2000). O protocolo de identificação dos subtipos possibilitou a amplificação de fragmentos com 328 pb para os subtipos 1/2, 3; e fragmentos de 356 pb para os subtipos 1/3 e 2. O marcador de peso molecular utilizado foi o 100 pb DNA Ladder (Amersham Pharmacia).

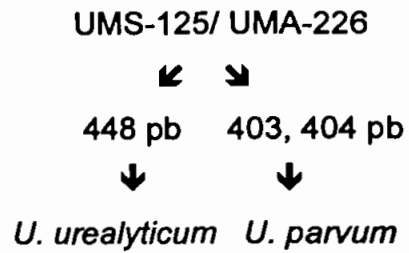
Na maioria das etapas de amplificação do DNA, a temperatura de desnaturação, alongamento e extensão e os tempos foram 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, respectivamente durante 40 ciclos. Exceto, para a determinação dos subtipos de *Ureaplasma urealyticum* que apresentou temperaturas de extensão específica a alguns "primers": 76°C para UMA-219; 74°C para UMA-219'; 62°C para UMS-112; 64°C para UMS-112'; 68°C para UMA-194 e 66°C para UMA-194'. Após, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídio e a visualização dos produtos de digestão foi obtida em transiluminador U.V..

A especificidade da região amplificada para as amostras positivas de *Ureaplasma parvum* com os "primers" UMS-125/UMA-269', resultando na amplificação do fragmento de 442,443 pb, foram testadas por digestão do produto amplificado com a enzima endonuclease *Hinf*I, obtendo-se fragmentos que foram interpretados como: sem corte das bandas, com corte e mistura de ambos. A digestão ocorreu em 20 µL de volume final da reação a 2 horas por 56°C, sendo que 10 µL do produto amplificado foi digerido com 1U de *Hinf*I (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA), 2,0 µL de tampão 10x REACT2® concentrado (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA). Estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corado com brometo de etídio. A visualização dos produtos de digestão foi feita em transiluminador U.V.

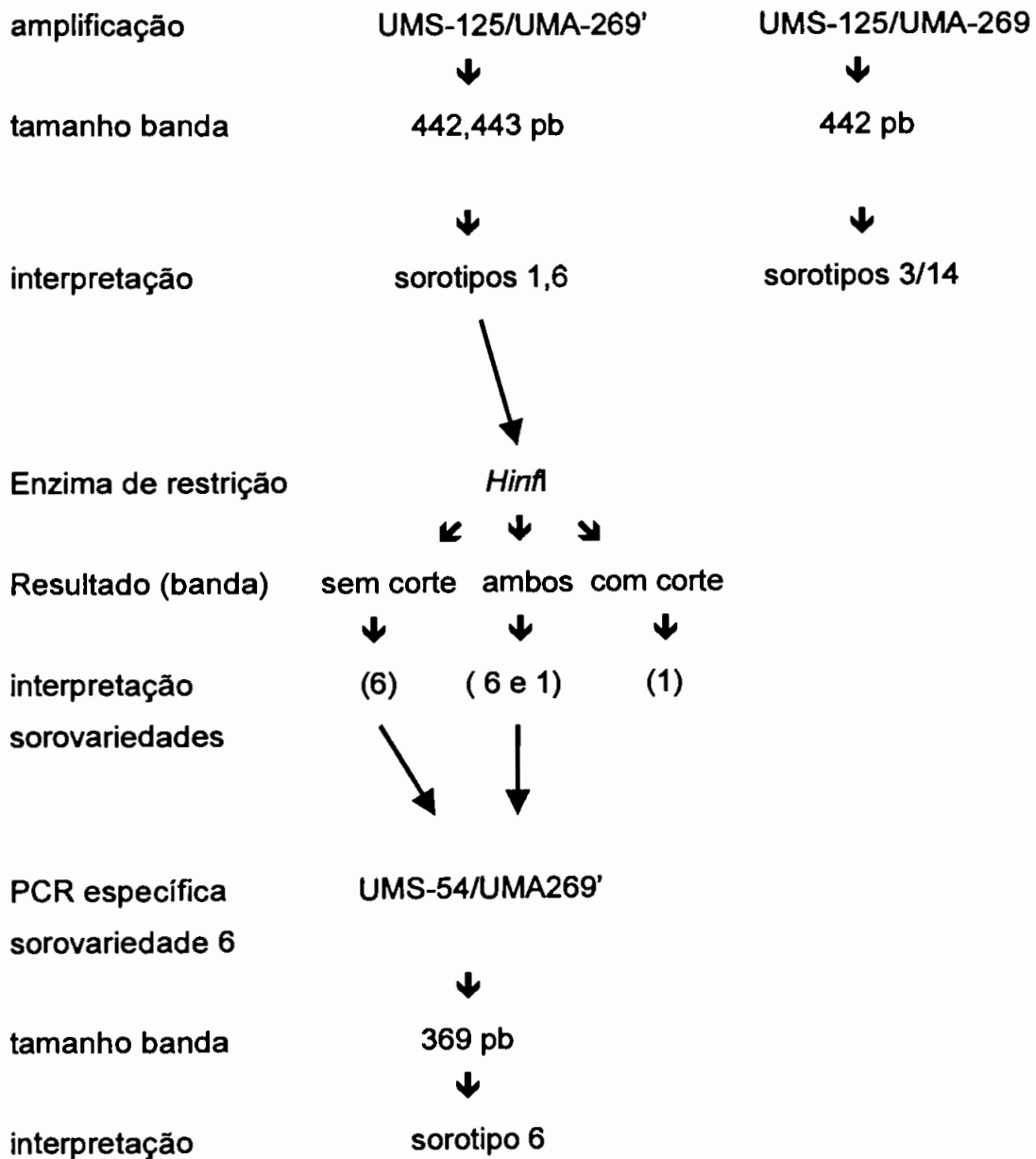
O esquema para identificação do gênero *Ureaplasma* está descrito segundo o algoritmo a seguir:

**A- Identificação das espécies do gênero *Ureaplasma spp.***

amplificação com "primers":



**B- Identificação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum***



**C- Identificação dos subtipos de *Ureaplasma urealyticum***

**C.1**

Amplificação	UMS 61/UMA 219	UMS 61/UMA 219'
Tamanho banda	328 pb	328 pb
Interpretação	subtipos 1/2	subtipo 3

**C.2**

Amplificação	UMS 112/UMA 194	UMS 112'/UMA 194'
Tamanho banda	356 pb	356 pb
Interpretação	subtipos 1/3	subtipo 2

### 3.3.7- Detecção do plasmídeo "tetM"

A PCR para determinação do plasmídeo de resistência foi realizada em todas as amostras com culturas positivas para *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma spp.*. A presença do plasmídeo "tetM" foi determinado a partir da obtenção de um fragmento de 397 pb após amplificação com a seqüência de "primers" abaixo, cuja especificidade foi determinada através da enzima de restrição *Taq I* (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA). A partir de alíquotas de 20 µL do produto da PCR, a digestão foi feita utilizando-se 1U da enzima de restrição *Taq I*, 5 µL de tampão One Phor All buffer 10x concentrado a uma temperatura de 37°C no volume final de 20 µL. Os produtos desta digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e foram observados através do transiluminador U.V. (BLANCHARD *et al.*, 1992).

O marcador de peso molecular utilizado foi o 100 pb DNA Ladder (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA).

"primer" sense: 5'- TTA TCA ACG GTT TAT CAG C -3'

"primer" anti sense: 5'- CGT ATA TAT GCA AGC G -3'



## **RESULTADOS**

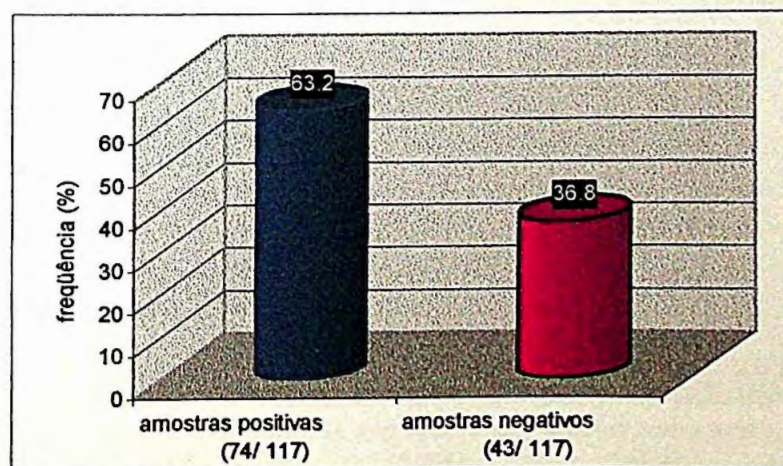
---

---

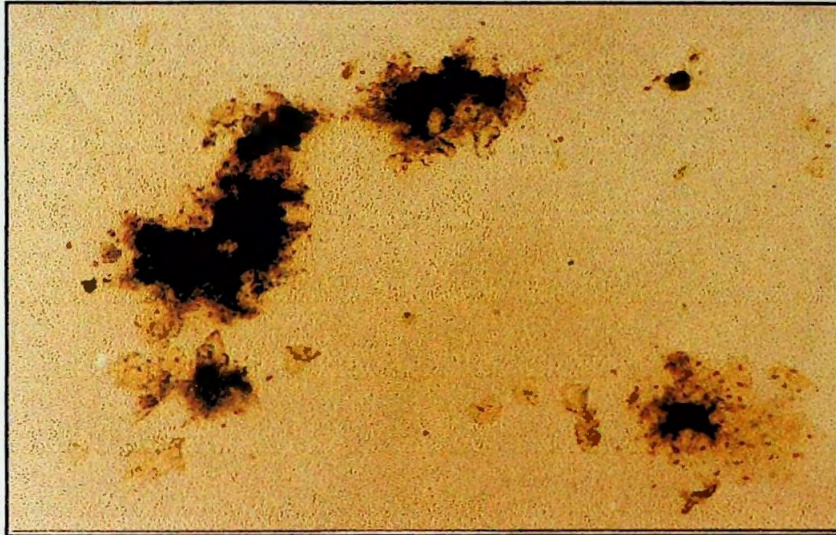
## 4- RESULTADOS

### 4.1- CULTURA DOS MICOPLASMAS

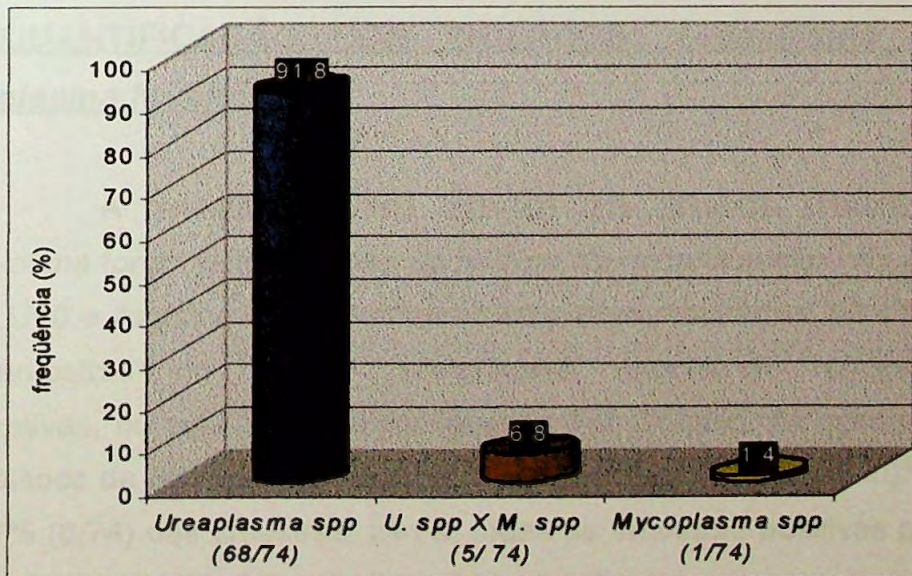
O resultado da cultura em meios líquidos e sólidos das amostras colhidas do fundo de saco de Douglas, mostrou um total de 63,2% (74/117) das amostras positivas para micoplasmas (Figura 01). Destes, 91,9% (68/74) das amostras foram positivas para *Ureaplasma spp.*, identificadas através da morfologia colonial típica no meio A7 (Figura 02) e pela alcalinização do meio líquido U10. Foram observados casos de co-infecção de *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma spp.* através da visualização de colônias no meio A7 e da alteração de cor do meio líquido de Arginina em 6,8% (5/74) dos casos e em 1,3% (1/74) dos casos foram observado somente *Mycoplasma spp.* (Figuras 03 e 04).



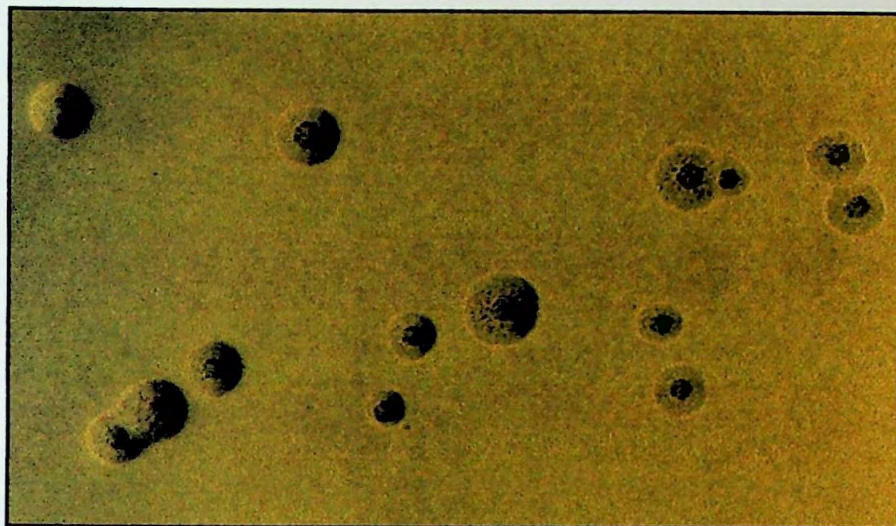
**Figura 01:** Resultado do cultivo em meios líquidos e sólidos obtidos das amostras clínicas de 117 gestantes.



**Figura 02:** Colônias de *Ureaplasma urealyticum* em meio sólido A7 (aumento de 100x).



**Figura 03:** Distribuição do resultado de 74 culturas positivas para as espécies dos gêneros *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma spp.*



**Figura 04:** Colônias de *Mycoplasma spp.* em meio sólido A7 (aumento de 100x).

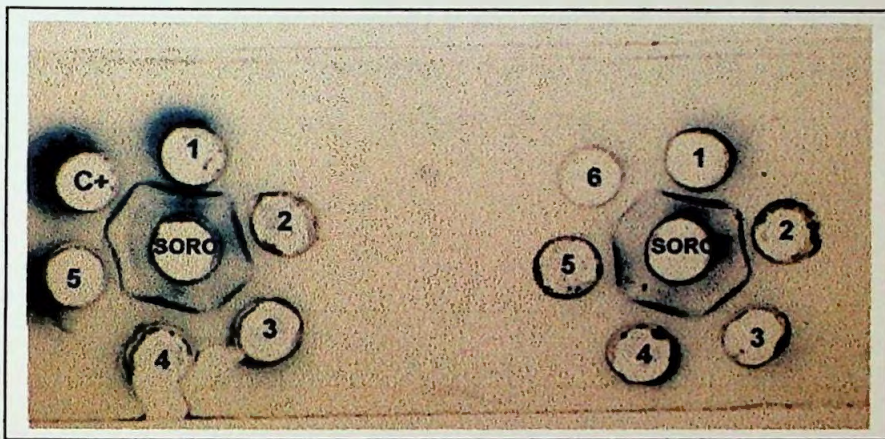
#### **4.2- QUANTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS: *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma hominis***

A quantificação dos isolados dos gêneros *Ureaplasma* e *Mycoplasma* foram feitas através da técnica de microtitulação nos meios de cultivo U10 e Arginina e apresentou os seguintes resultados: 82,4% (61/74) das amostras do gênero *Ureaplasma*, mostraram concentrações significativas, ou seja, maiores ou iguais a  $10^4$  CCU/ml. As concentrações dos isolados de *Mycoplasma hominis* foram maiores ou iguais a  $10^3$  CCU/ml em 8,1% (6/74) das amostras, isto é, todas as amostras positivas para esta espécie foram detectadas em altas concentrações.

#### 4.3- IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE *Mycoplasma hominis*

A identificação dos isolados de *Mycoplasma spp.* como sendo de *M. hominis* foi possível utilizando-se o teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony e soro policlonal anti-*Mycoplasma hominis*.

Das 6 cepas identificadas através do cultivo, todas foram positivas para *Mycoplasma hominis* (Figura 5).



**Figura 05:** Imunodifusão dupla de OUCHTERLONY em gel de ágar. A linha de identidade pode ser observada para as 6 amostras (mais um controle positivo) ao redor do orifício central contendo soro imune anti-*Mycoplasma hominis*.

#### 4.4- IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS ATRAVÉS DA PCR

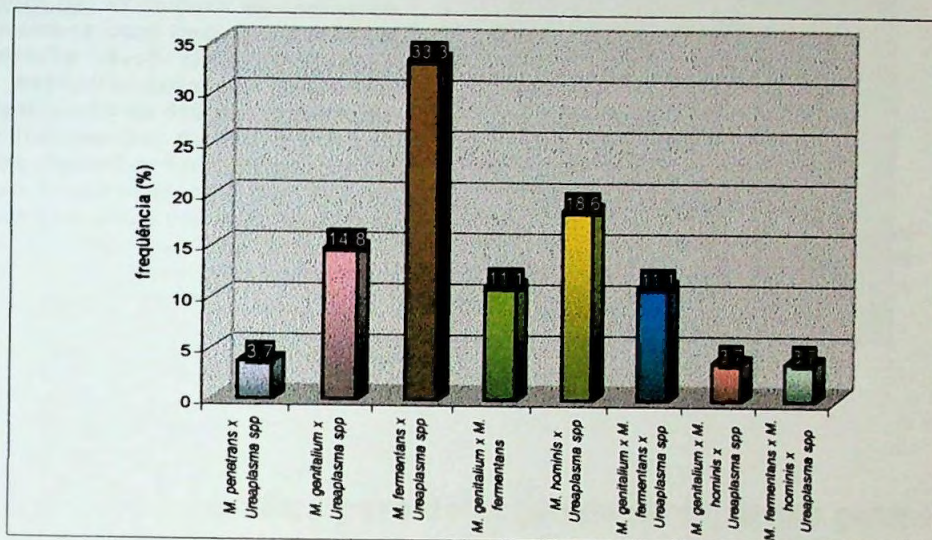
A identificação das espécies de micoplasmas através da reação em cadeia pela polimerase mostrou-se importante para demonstrar a presença das espécies: *M. penetrans*, *M. fermentans*, *M. genitalium* no grupo de gestantes estudado e a prevalência das espécies mais comumente encontradas *M. hominis* e as do gênero *Ureaplasma spp.*, além da presença de co-infecções (Anexo 05).

A técnica da PCR mostrou uma positividade de 73,5% (86/117) enquanto que 26,5% (31/117) foram negativos (Figura 06). Dentre os positivos, 2,3% (2/86) das amostras foram positivas para *Mycoplasma penetrans*; 6,7% (6/86) para *Mycoplasma fermentans*; 4,7% (4/86) para *Mycoplasma hominis*; 54,7% (47/86) para *Ureaplasma spp* e 31,3%(27/86) para casos de co-infecção (Figura 07). A distribuição dos micoplasmas nas co-infecções foram: 3,7% (1/27) para *M. penetrans* e *Ureaplasma spp.*; 14,8% (4/27) para *M. genitalium* e *Ureaplasma spp.*; 33,3% (9/27) para *M. fermentans* e *Ureaplasma spp.*; 11,1% (3/27) para *M. genitalium* e *M. fermentans*; 18,6% (5/27) para *M. hominis* e *Ureaplasma spp.*; 11,1% (3/27) para *M. fermentans*, *M. genitalium* e *Ureaplasma spp.*; 3,7% (1/27) para *M. genitalium*, *M. hominis* e *Ureaplasma spp.* e 3,7% (1/27) para *M. fermentans*, *M. hominis* e *Ureaplasma spp.* (Tabela IV) (Figura 08).

**Tabela IV:** Distribuição dos micoplasmas em 86 amostras positivas por PCR.

<b>Espécies de micoplasmas detectadas por PCR</b>	<b>Número de casos</b>	<b>%</b>
<i>M. penetrans</i>	2	2,3
<i>M. fermentans</i>	6	6,7
<i>M. hominis</i>	4	4,7
<i>Ureaplasma spp.</i>	47	54,7
<i>M. penetrans x Ureaplasma spp.</i>	1	1,2
<i>M. genitalium x Ureaplasma spp.</i>	4	4,7
<i>M. fermentans x Ureaplasma spp.</i>	9	10,5
<i>M. genitalium x M. fermentans</i>	3	3,5
<i>M. hominis x Ureaplasma spp.</i>	5	5,8
<i>M. genitalium x M. fermentans x Ureaplasma spp.</i>	3	3,5
<i>M. genitalium x M. hominis x Ureaplasma spp.</i>	1	1,2
<i>M. fermentans x M. hominis x Ureaplasma spp.</i>	1	1,2
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>100</b>

Nota da DBDCQ: No impresso original está faltando a página 63.



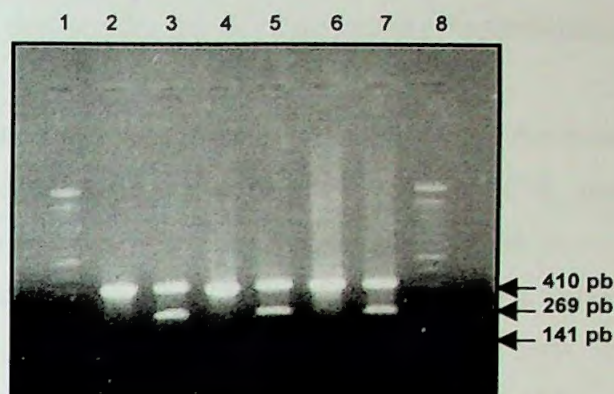
**Figura 08:** Frequência das espécies de micoplasmas, encontrada em 27 casos de co-infecções.

#### 4.4.1- PCR específica para detecção de *Mycoplasma penetrans*

A identificação de *Mycoplasma penetrans* através de produtos amplificados pelo par de “primers” que codificam a região 16S do rRNA, resultaram em um fragmento de 410 pb, encontrados em 3,5% (3/86) amostras clínicas positivas das gestantes. A especificidade destes produtos foi testado pela enzima de restrição Avall, onde a digestão resultou em fragmentos de 269 e 141 pb (Figura 09).

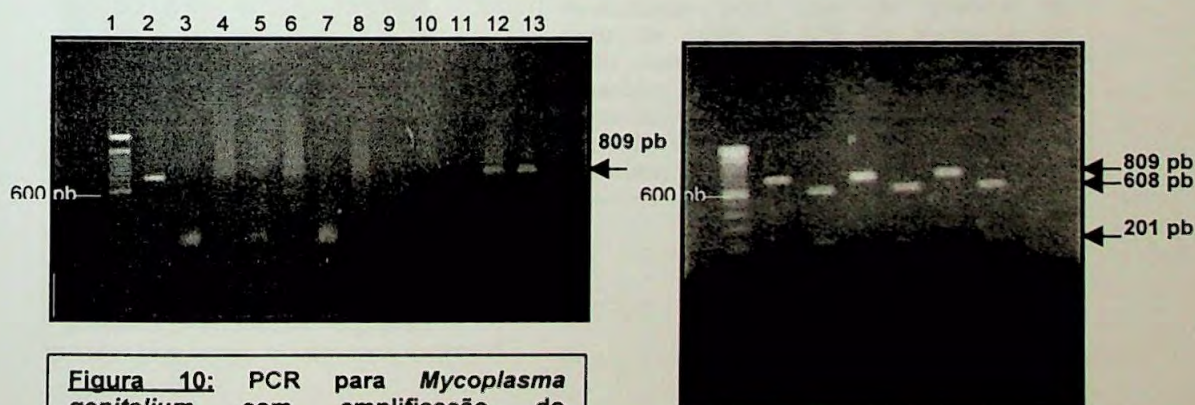


**Figura 09:** PCR para *Mycoplasma penetrans* com uso da enzima de restrição *AvaI* para verificação da especificidade do fragmento amplificado de 410 pb, resultando em fragmentos de 269 e 141 pb, após digestão. 1 e 8) Marcador de peso molecular 100 pb, 2 e 4) amostras positivas sem digestão; 3 e 5) amostras positivas após digestão; 5-6) controles positivos.



#### 4.4.2- PCR específica para detecção de *Mycoplasma genitalium*

A detecção da espécie *Mycoplasma genitalium* por PCR ocorreu em 12,8% (11/86) das amostras testadas. A positividade da amplificação dos produtos foi um fragmento de 809 pb (Figura 10). A especificidade do produto de amplificação foi testada pela digestão com a enzima de restrição *XbaI*, onde resultado obtido foram fragmentos de 608 e 201 pb (Figura 11).



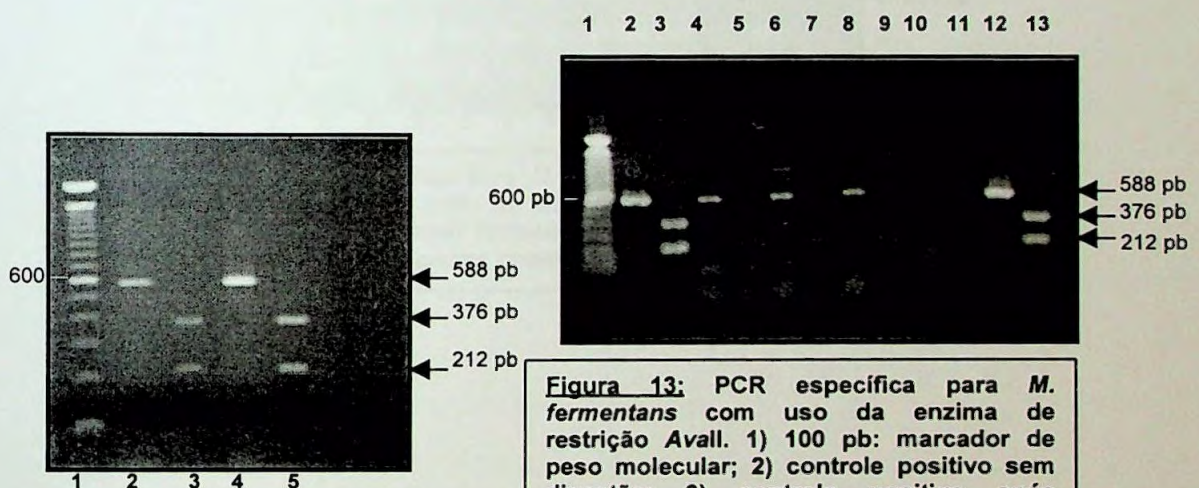
**Figura 10:** PCR para *Mycoplasma genitalium* com amplificação do fragmento de 809pb. 1) 100 pb marcador de peso molecular; 2) controle positivo; 3) controle negativo; 4 a 11) amostras negativas; 12 e 13) amostras positivas para a amplificação do fragmento de 809 pb.

**Figura 11:** PCR para *M. genitalium* com uso da enzima de restrição (fragmentos de 608 e 201 pb. 1) 100 pb marcador de peso molecular; 2) controle positivo sem digestão; 3) controle positivo após digestão com *XbaI*; 4 e 6) amostras positivas sem digestão; 5 e 7) amostras positivas após digestão com *XbaI*.

#### 4.4.3- PCR específica para detecção de *Mycoplasma fermentans*

Dentre as amostras testadas para detecção de *Mycoplasma fermentans*, obtivemos 25,6% (22/86) positivas pela técnica da PCR, através dos "primers" específicos que resultaram em um fragmento de 588 pb.

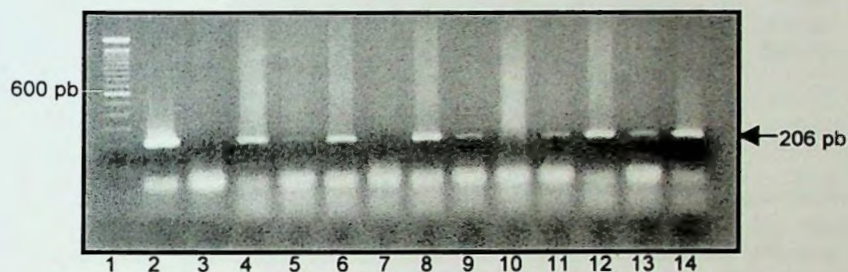
Com o objetivo de determinar a especificidade dos "primers" utilizados, submetemos o produto amplificado ao tratamento com *Avall*, obtendo-se os perfis de restrição com 212 e 376 pb (Figuras 12 e 13).



**Figura 12:** PCR específica para *M. fermentans* com uso da enzima de restrição *Avall*. 1) 100 pb: marcador de peso molecular; 2) controle positivo sem digestão; 3) controle positivo após digestão; 4) amostra positiva sem digestão; 5) amostra positiva com digestão.

**Figura 13:** PCR específica para *M. fermentans* com uso da enzima de restrição *Avall*. 1) 600 pb: marcador de peso molecular; 2) controle positivo sem digestão; 3) controle positivo após digestão; 4-6-8-12) amostras positivas sem digestão; 5-7-9-13) amostras positivas com digestão; 10 e 11) controles negativos.

A utilização de um segundo par de "primer" foi feita para confirmação da presença da espécie *Mycoplasma fermentans* nas amostras clínicas, tentando assim evitar qualquer reação cruzada com *Mycoplasma hominis*. Este par de "primers" gerou um fragmento de 206 pb da região 16S do rRNA, sendo positivo para todas as amostras testadas com o primeiro par de "primer" (Figura 14).



**Figura 14:** PCR específica para *M. fermentans* com o segundo par de primers utilizado, resultando na amplificação do produto de 206 pb. 1) 100 pb: marcador de peso molecular; 2) controle positivo; 3) controle negativo; 4-6 e 8-14) amostras positivas; 7) amostra negativa.

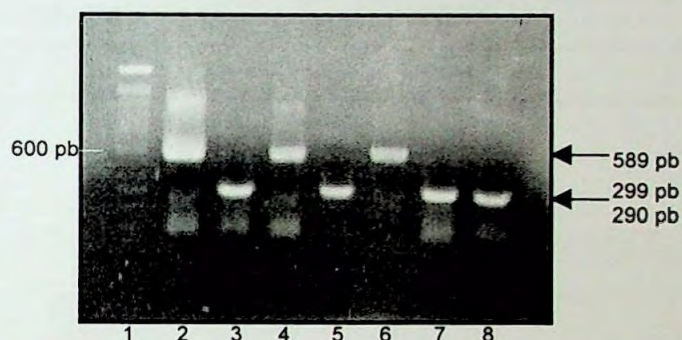
#### 4.4.4- PCR específica para detecção de *Mycoplasma hominis*

A detecção de *Mycoplasma hominis* através da seqüência de "primers" que amplificam produtos que geram um fragmento de 589 pb foi analisada em todas as amostras clínicas coletadas e esta espécie foi detectada em 12,8% (11/86) do total de amostras clínicas testadas.

A especificidade dos "primers" utilizados foi determinada através do tratamento com a enzima de restrição *KpnI* (Figura 15).

A identificação de *Mycoplasma hominis* também foi realizada através de produtos amplificados pelo par de "primers" que codificam a região 16S do rRNA e resultaram em um fragmento de 334 pb. Com o

objetivo de determinar a especificidade dos “*primers*” utilizados, o produto amplificado ao tratamento com *Hind*III, obtendo-se os perfis de restrição de fragmentos com 269 e 141 pb para todos os isolados positivos no primeiro par de “*primer*”, confirmando a presença deste micoplasma nas amostras.



**Figura 15:** Resultado da PCR em amostras positivas de *Mycoplasma hominis*. Nesta reação foi utilizado o primeiro par de primers que resultou na amplificação de um produto com 589 pb. Sua especificidade foi revelada através da digestão com a enzima de restrição *Kpn*I, resultando em produtos de 299 e 290 pb. 1) marcador de peso molecular 100 pb. 2 e 3) controles positivos. 4 e 6) amostras positivas antes da digestão. 5-7 e 8) amostras positivas após a digestão.

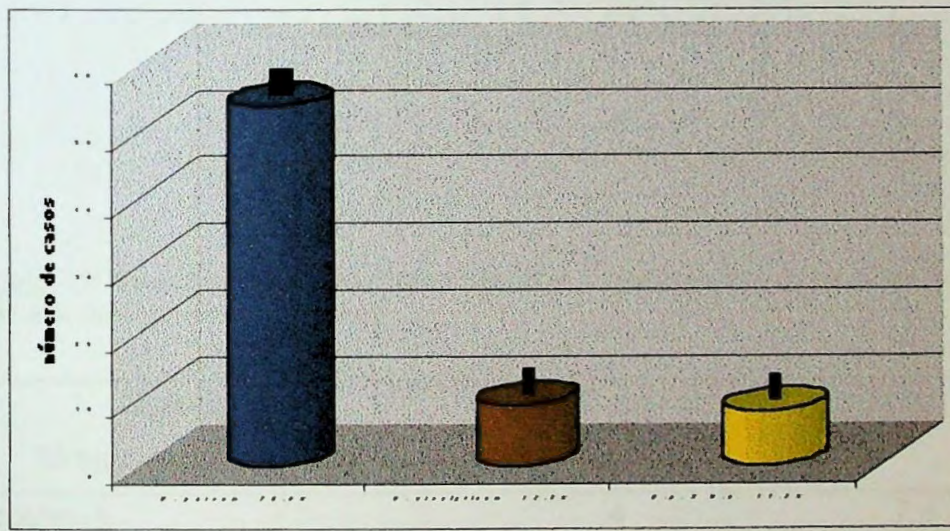
#### 4.4.5- PCR específica para identificação das espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*

⇒ **Determinação de biotipos do gênero *Ureaplasma* spp.**

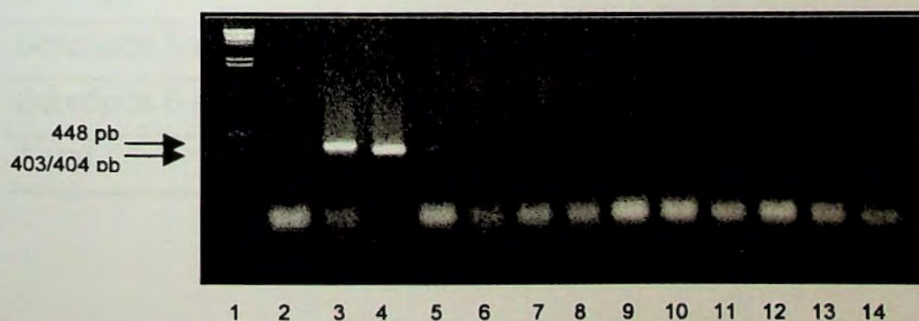
A detecção de *Ureaplasma* spp. com a diferenciação entre os biotipos foi realizada em todas as 86 amostras clínicas positivas pela PCR. Assim, dentre as 82,6% (71/86) que foram identificadas como *Ureaplasma* spp. (Figura 16), 76,0% (54/71) foram identificadas como sendo *Ureaplasma parvum* (antes Parvo ou biotipo 1) e 12,7% (9/71) como *Ureaplasma urealyticum* (T960 ou biotipo 2). Em 11,3% dos casos (8/71) foi observada co-infecção por ambas as espécies (Figura 17) (Tabela V).

**Tabela V:** Resultado das amostras positivas para a identificação dos biotipos dos isolados do gênero *Ureaplasma spp.*, através da PCR.

Gênero	Número de casos	% casos
<i>Ureaplasma spp</i>	71/86	82.6%
Biotipos		
<i>Ureaplasma parvum</i>	54/71	76.0%
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	9/71	12.7%
Co-infecções	8/71	11.3%



**Figura 16:** Identificação dos 71 isolados do gênero *Ureaplasma spp.* nas espécies *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, através da Reação em Cadeia da Polimerase.



**Figura 17:** PCR para *Ureaplasma* com detecção das espécies *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* com os primers UMS 125/ UMS 226. 1)  $\phi$ X174 DNA/HaeIII marcador de peso molecular; 2) controle negativo; 3) controle positivo de 448 pb: *U. urealyticum*; 4) controle positivo de 403-404 pb de *U. parvum*; 5 a 14) amostras das pacientes.

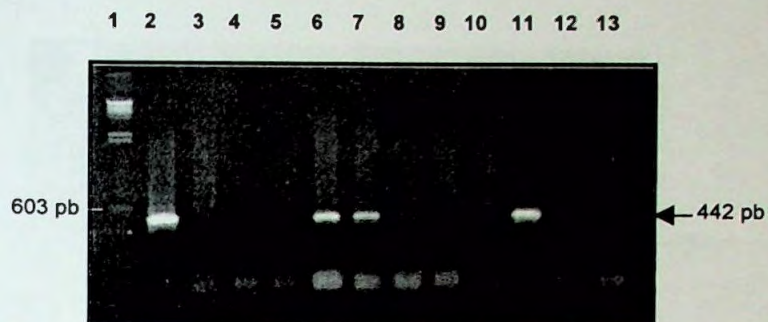
⇒ **Determinação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum***

Para as amostras que foram PCR positiva para *Ureaplasma parvum*, foi realizada através da PCR a determinação dos sorotipos 1, 6, 3 e 14 (Tabela VI), tendo sido observada uma positividade de: 7,4% (4/54) para sorotipo 1; 25,9% (14/54) para sorotipo 6 e 35,2% (19/54) para sorotipos 3/14. Também na identificação dos sorotipos observou-se co-infecção a saber: 11,1% (6/54) foram positivas para os sorotipos 1 e 6; 5,6% (3/54) para os sorotipos 1 e 3/14; e 14,8% (8/54) para os sorotipos 6 e 3/14.

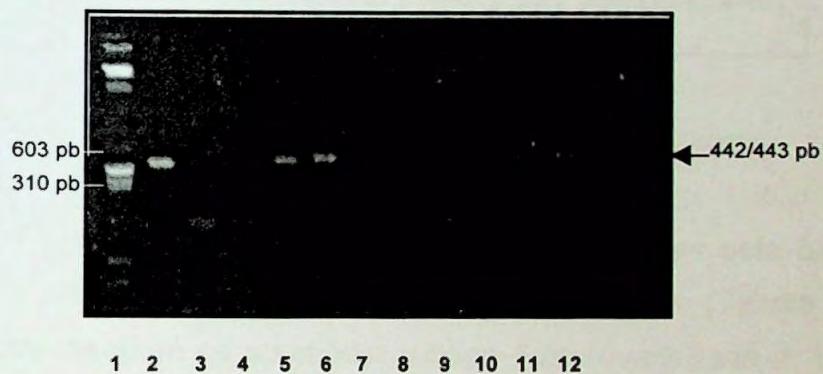
Todos as etapas realizadas para determinação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum* estão ilustradas nas Figuras 18, 19, 20, 21.

**Tabela VI:** Resultado da determinação dos sorotipos de *U. parvum* através da PCR em 54 amostras positivas.

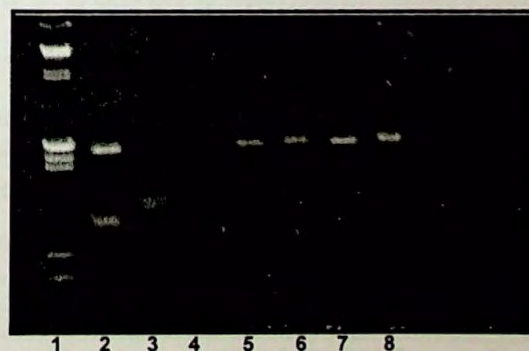
Sorotipos	Número de casos	%
<b><i>Ureaplasma parvum</i></b>		
Sorotipo 1	4	7.4
Sorotipo 6	14	25.9
Sorotipos 3/14	19	35.2
<b>Co-infecções</b>		
Sorotipo 1 e 6	6	11.1
Sorotipos 1 e 3/14	3	5.6
Sorotipos 6 e 3/14	8	14.8
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>100</b>



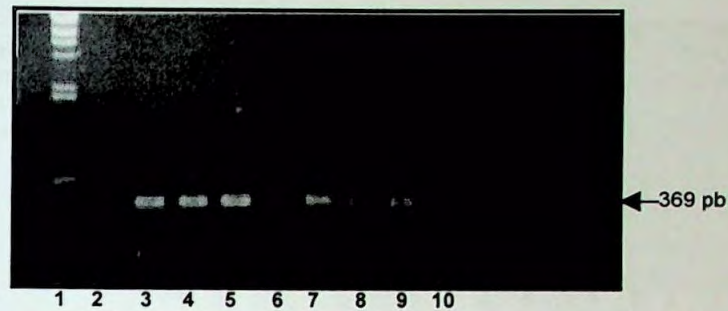
**Figura 18:** Reação da Polimerase em cadeia para determinação dos sorotipos 3/14 de *Ureaplasma parvum*, com os primers UMS 125/UMA269. 1) padrão de peso molecular:  $\phi$ X174 DNA/HaeIII; 2) C+ 442 pb; 3-) C-; 4-5-8-9-10-12-13) amostras negativas; 6-7 e 11)



**Figura 19:** Reação da Polimerase em cadeia para determinação dos sorotipos 1 e 6 de *Ureaplasma parvum*. Primeira etapa com os primers UMS 125/ UMA 269'. 1) padrão de peso molecular:  $\phi$ X174 DNA/HaeIII; 2) C+ 442, 443 pb; 3) C-; 5-6-7-11-12) amostras positivas; 4-8-9-10) amostras negativas.



**Figura 20:** Reação da Polimerase em cadeia para determinação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum*, com análise do perfil de restrição para diferenciação entre os sorotipos 1 e 6 com a enzima *Hinf*I. 1) padrão de peso molecular:  $\phi$ X174 DNA/HaeIII; 2) amostra positiva para os sorotipos 1 e 6: "mix"; 3) amostra positiva para sorotipo 1: "cut"; 4-5-6-7-8) amostras positivas para sorotipo 6: "uncut".



**Figura 21:** Reação da Polimerase em Cadeia para determinação dos sorotipos de *Ureaplasma parvum*, com os primers UMS 54/ UMA 269', específicos para identificação da sorovar 6. 1-) padrão de peso molecular:  $\phi$ X174 DNA/HaeIII; 2-) controle negativo; 3-) controle positivo para sorotipo 6; 4-5-6-8-9-) amostras positivas para sorotipo 6; 6-10-) amostras negativas.

#### ⇒ Determinação dos subtipos de *Ureaplasma urealyticum*

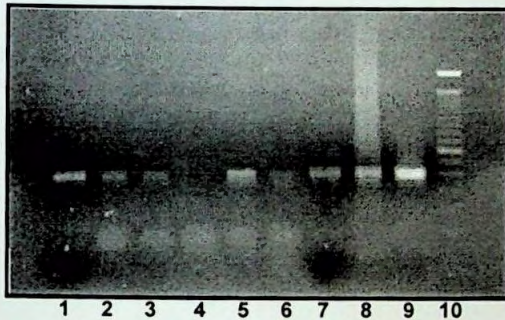
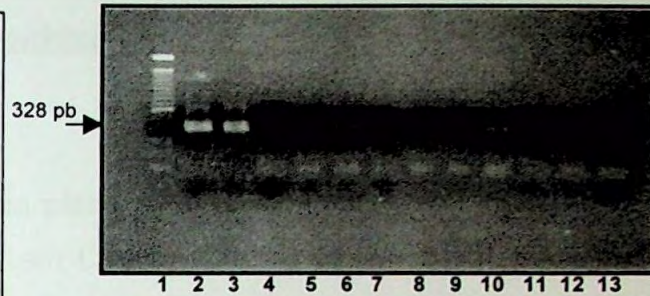
Todas as 17 amostras positivas identificadas pela biotipagem como sendo *Ureaplasma urealyticum* foram subtipadas (Tabela VII). Os subtipos compreendem os sorotipos: subtipo 1 (sorovariedade 2, 5, 8 e 9); subtipo 2 (sorotipos 4, 10, 12 e 13); e subtipo 3 (sorotipos 7 e 11) (Figura 22). Dentre estas: 35,3% (6/17) foram identificadas como somente subtipo 2 (Figura 23); 29,4% (5/17) como somente subtipo 1/3 (Figura 24); 11,8% (2/17) das amostras foram subtipos 1/3 e 2; 17,6% (3/17) das amostras foram subtipos 1/3 e 3; e 5,9% (1/17) das amostra foram subtipos 2 e 3.

**Tabela VII:** Resultado das amostras clínicas positivas na identificação dos subtipos dos 17 isolados da espécie *Ureaplasma urealyticum*, através da PCR.

Subtipos	Número de casos	%
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		
Subtipo 2	6/ 17	35.3
Subtipo 1/3	5/ 17	29.4
Subtipos 1/3 e 2	2/ 17	11.8
Subtipos 1/3 e 3	3/ 17	17.6
Subtipos 2 e 3	1/ 17	5.9

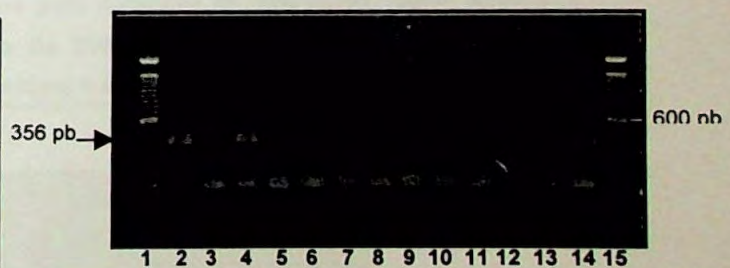


**Figura 22:** Reação em Cadeia da Polimerase para determinação dos subtipos da espécie *Ureaplasma urealyticum*, com uso dos primers UMS 61/UMA 219', específicos para subtipo 3, resultando em um produto amplificado de 328 pb. 1) marcador de peso molecular 100 pb; 2) controle positivo; 13) controle negativo; 3-6-10) amostras positivas; 4-5-7-8-9-11-12) amostras negativas.



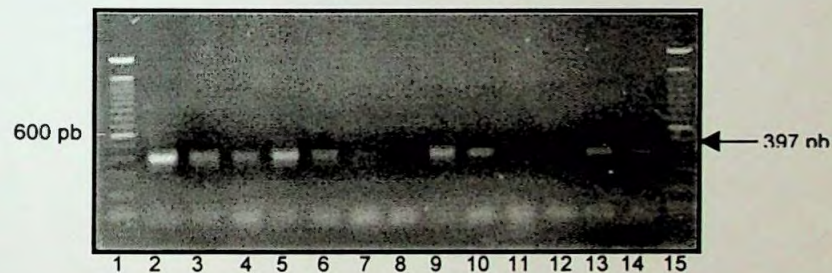
**Figuras 23:** Reação em Cadeia da Polimerase para determinação dos subtipos da espécie *Ureaplasma urealyticum*, com uso dos primers UMS 112'/UMA 194' específicos para subtipo 2, resultando em um produto amplificado de 356 pb. 1, 2, 3, 5 a 8) amostras positivas; 4) amostra negativa; 9) controle positivo; 10) marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder.

**Figura 24:** Reação em Cadeia da Polimerase para determinação dos subtipos da espécie *Ureaplasma urealyticum*, com uso dos primers UMS 112/ UMA 194, específicos para subtipo 1/3, resultando em um produto amplificado de 356 pb. 1 e 15) marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder; 2) controle positivo; 3) controle negativo; 4-7-9-12-14) amostras positivas; 5-6-8-10-11-13) amostras negativas.

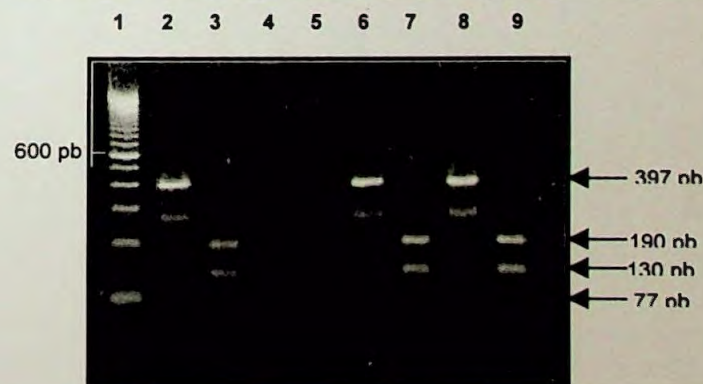


#### 4.5- PCR específico para detecção do plasmídeo "tetM" em amostras cervicais positivas para *Ureaplasma spp* e *Mycoplasma spp*

A presença do plasmídeo de resistência foi testada em todas as amostras com Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) positivas para *Mycoplasma spp.* e *Ureaplasma spp.*, onde foram encontrados os seguintes resultados: 36,4% (4/11) para *Mycoplasma spp.* e 59,2% (42/71) para *Ureaplasma spp.*. Dentre os resultados de PCR detectados como gênero *Ureaplasma spp.*, 61,1% (33/54) foram identificados como "tetM" positivos para a espécie *Ureaplasma parvum*; 44,4% (4/9) para *Ureaplasma urealyticum* e 62,5% (5/8) para co-infecção de *U. parvum* x *U. urealyticum* (Figuras 25 e 26).



**Figura 25:** PCR específica para detecção do plasmídeo "tetM" com amplificação do produto de 397 pb: 1 e 15) marcador de peso molecular; 2) controle positivo; 1 a 14) amostras testadas.



**Figura 26:** PCR para detecção do plasmídeo "tetM" com análise do perfil de restrição através da enzima de restrição *Taq I*. O tamanho dos produtos de amplificação foram: 190 pb, 130 pb e 77 pb. 1) marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder; 2) controle positivo sem análise; 3) controle positivo com *Taq I*; 4 e 5) amostras negativas; 6 e 8) amostras positivas sem *Taq I*; 7 e 9) amostras positivas com *Taq I*.

## ***DISCUSSÃO***

---

## **5- DISCUSSÃO**

Este estudo teve como objetivo a detecção das principais espécies de micoplasmas do trato geniturinário conhecidas como sendo responsáveis por infecções e distúrbios de reprodução humana, bem como de espécies cuja prevalência é pouco conhecida em nosso país. Embora a literatura internacional seja bastante vasta quanto ao estudo das micoplasmoses humanas, no Brasil são poucos os grupos de pesquisadores que vem desenvolvendo estudos sobre as várias espécies deste grupo. Dentro deste contexto, este projeto visou determinar a prevalência de micoplasmas, ainda em gestantes não descritos, esperando contribuir com mais dados sobre os possíveis agentes que possam estar envolvidos nos insucessos da gestação.

O aprimoramento e o desenvolvimento de novas metodologias laboratoriais propiciou um grande avanço na micoplasmologia, possibilitando a detecção, isolamento e caracterização de várias novas espécies. O isolamento e a identificação de micoplasmas em material cervical de gestantes têm sua grande importância no estudo das alterações clínicas do trato geniturinário (HENRY-SUCHET *et al.*, 1980; MOLLER *et al.*, 1984; TAYLOR-ROBINSON *et al.*, 1995; TAYLOR-ROBINSON e FURR 1997; TRUM, 2000) e a sua consequência no comprometimento fetal (CASSEL *et al.*, 1983; BRUS *et al.*, 1991; HEGGIE, 1994; ALFA, 1995; TAYLOR-ROBINSON, 1996a).

O método de identificação de micoplasmas através do cultivo é um procedimento muito eficiente, mais acessível economicamente e relativamente rápido para detecção de algumas espécies, tais como *M. hominis* e *U.*

*urealyticum*. Contudo, a utilização de novas tecnologias, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) na detecção de várias espécies de micoplasmas, como uma alternativa diagnóstica da infecção micoplásmica em materiais cervicais de gestantes é de grande importância. Em virtude da natural alteração fisiológica na gravidez pode haver intensa colonização microbiana, dificultando uma avaliação real dos isolados pelo cultivo. A perspectiva de detecção por PCR das espécies de difícil cultivo: *M. penetrans*, *M. fermentans* e *M. genitalium*, possibilitaria uma melhor avaliação, do envolvimento da infecção micoplásmica e as patologias na gestante e no feto (DINSMOOR *et al.*, 1989; SANCHEZ *et al.*, 1990; MONTORO, A.S., 1992).

As amostras foram colhidas do fundo de saco de Douglas, com auxílio de swab alginatado neutro e transportado em meio de transporte A3xb (SHEPARD, 1976, mod.). Este sítio foi escolhido devido ao pH ser um pouco mais elevado e pelo menor potencial de óxido-redução local em relação ao do fluxo vaginal, facilitando a colonização. Após a coleta, o transporte em meio A3xb utilizando banho de gelo possibilitou a manutenção da viabilidade dos micoplasmas, até o momento da cultura (RAZIN & FREUNDT, 1984).

A caracterização das espécies do gênero *Mycoplasma spp.* e *Ureaplasma spp.* foi baseada na morfologia colonial característica nos meios sólido A7 e SP-4, no comportamento bioquímico que possibilitou a identificação de *Ureaplasma spp.* no meio líquido U10 e de *Mycoplasma spp.* nos meios líquidos arginina, glicose, SP-4. A identificação sorológica de *M. hominis* ocorreu com soro imune específico através do teste de imunodifusão dupla e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi realizada principalmente para a identificação das espécies com crescimento mais fastidioso.

Nossos resultados demonstraram a presença de todas as espécies de micoplasmas aqui pesquisadas. Foi observado no cultivo das amostras, uma alta taxa de positividade de 63,2% (74/117), em meios sólidos e líquidos. Destes, *Ureaplasma spp.* estava presente em 91,9% (68/74) das pacientes. As espécies deste gênero foram detectadas nas amostras do

material cervical em concentrações significativas, ou seja, maiores ou igual a  $10^4$  CCU/ml em 82,4% (61/74) pacientes através da técnica de microtitulação em meio líquido U10. A co-infecção de *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma spp.* foi observada em 6,8% (5/74) das amostras e apenas em 1,3% (1/74) caso foi detectado apenas *Mycoplasma spp.* As concentrações dos isolados de *Mycoplasma spp.* foram maiores ou iguais a  $10^3$  CCU/ml em todas as amostras onde este agente estava presente, identificadas posteriormente por sorologia como *M. hominis*.

A elevada concentração das espécies do gênero *Ureaplasma spp.* presente na maioria das amostras, quando comparada a *Mycoplasma spp.*, sugere que estes microrganismos talvez possam estar desempenhando algum papel patogênico nestas pacientes, e não somente estarem como simples comensais. Estudos de associação entre os dados clínicos e a fenotipagem bem como de cinética de multiplicação desses agentes seria um importante campo a ser estudado.

Para as espécies com crescimento mais difícil, a PCR possibilitou a identificação de *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasmas fermentans*, além da presença de vários casos de co-infecções e a identificação das espécies mais comumente encontradas do gênero *Ureaplasma spp.* (*U. urealyticum* e *U. parvum*) e *Mycoplasma hominis*. A técnica da PCR mostrou uma positividade de 73,5% (86/117) das amostras para a pesquisa de micoplasmas quando 117 materiais cervicais de gestantes foram analisadas. Entre estas, 2,3% (2/86) das amostras foram positivas somente para *Mycoplasma penetrans*; 7,0% (6/86) para *Mycoplasma fermentans*; 4,7% (4/86) para *Mycoplasma hominis*; 54,7% (47/86) para *Ureaplasma spp.* e 31,3% (27/86) para co-infecção entre as espécies. Casos de co-infecções foram detectados em uma alta frequência sendo: 3,7% (1/27) para *M. penetrans* e *Ureaplasma spp.*; 14,8% (4/27) para *M. genitalium* e *Ureaplasma spp.*; 33,3% (9/27) para *M. fermentans* e *Ureaplasma spp.*; 11,1% (3/27) para *M. genitalium* e *M. fermentans*; 18,6% (5/27) para *M. hominis* e *Ureaplasma*

spp.; 11,1% (3/27) para *M. fermentans*, *M. genitalium* e *Ureaplasma spp.*; 3,7% (1/27) para *M. genitalium*, *M. hominis* e *Ureaplasma spp.* e 3,7% (1/27) para *M. fermentans*, *M. hominis* e *Ureaplasma spp.*. Estes dados chamam-nos a atenção uma vez que não há relatos de taxas tão altas de positividade, e também as inúmeras associações encontradas em co-infecções.

Na avaliação individual das espécies menos isoladas, a detecção de *Mycoplasma fermentans* por PCR, possibilitou demonstrar sua presença em gestantes de nossa população em 25,6% (22/86) das amostras. Este dado chama-nos a atenção para a necessidade de uma avaliação mais detalhada de seu papel neste grupo, podendo ser considerados de grande relevância, uma vez que em outros estudos *M. fermentans* foi detectado no fluido amniótico de quatro casos de cesariana dentre 232 mulheres estudadas com membrana intacta. Destes, três foram coletados do tecido placentário, sendo todos PCRs-positivos para o microrganismo. Assim, esta espécie deve ser objeto de novos estudos como causa de infecção materna e fetal (CASSEL *et. al.*, 1997), e nossa pesquisa com isso demonstra dados muito animadores em relação à validade de nossos esforços e ao objetivo deste projeto.

Em nosso estudo, a taxa de detecção da espécie *Mycoplasma genitalium* por PCR ocorreu em 12,8% (11/86) das amostras testadas, menor do que a relatada por alguns autores, em torno de 20%, os quais classificaram-no como a terceira causa mais freqüente de casos de uretrites não gonocócicas (TAYLOR-ROBINSON, 1997). Porém, nossos resultados podem ser considerados semelhantes ou um pouco mais altos do que a detectada por UNO *et. al.* (1997), em estudo com mulheres japonesas com material cervical, onde o microrganismo foi encontrado através da PCR em uma prevalência de 7,8% das pacientes com cervicites e 5,7% com adnexite.

A identificação de *Mycoplasma penetrans*, através de produtos amplificados em 3,5% (3/86) das amostras das gestantes permitiu demonstrar que este microrganismo está presente também nesse grupo, não havendo relatos similares na literatura internacional, uma vez que os registros referem-se

a pacientes HIV positivos (LO *et al.*, 1991a; WANG *et al.*, 1992; SASAKI *et al.*, 1994). Assim, este achado trouxe muita expectativa dentro deste estudo, uma vez que até o presente momento este é o primeiro relato da identificação de *M. penetrans* em gestantes na nossa população.

A detecção de *Mycoplasma hominis* através da PCR foi positiva para 12,8% (11/86) do total de amostras testadas, sendo que pelo cultivo foram detectados somente 6 casos. Observa-se que em nosso trabalho as porcentagens de isolamento de *Mycoplasma hominis* pela cultura foi inferior às taxas de infecção observadas por CASSEL *et al.* (1983), que foi de 21% em gestantes normais. Os autores observaram ainda que a taxa de isolamento no líquido amniótico e cérvix de gestantes que tiveram em seguida parto prematuro era maior do que em relação àquelas com parto normal. Este fato leva a acreditar que as mulheres com vaginose bacteriana possuem cinco vezes mais probabilidade de terem parto prematuro do que as não infectadas (HAY *et al.*, 1994).

O papel das espécies do gênero *Ureaplasma spp.* na etiologia das uretrites e cervicites é indiscutível, apesar deste também poder se apresentar como um comensal do TGU (TAYLOR-ROBINSON, 1997). A importância de seu isolamento é o impacto causado pela transmissão sexual entre os parceiros, podendo levar a infertilidade, além de induzir problemas no parto até mesmo complicações com o feto (CASSEL *et al.*, 1983; HOROWITZ *et al.*, 1995). A quantificação dos isolados revelou 82,4% em concentrações superiores ou iguais a  $10^4$  CCU/ml, concentrações estas, consideradas indicativo de infecção.

Nos últimos anos, várias diferenças fenotípicas e genotípicas têm sido descritas para *Ureaplasma urealyticum* e que culminaram com sua classificação em duas espécies, consideradas com níveis de patogenicidade diferentes (KOCH *et al.*, 2000). Nossos dados sobre a detecção de *Ureaplasma spp.* com a diferenciação entre as espécies *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum* realizada em todas 117 amostras estudadas, demonstrou que



dentre 82,6% (71/86) amostras positivas para *Ureaplasma*, 76,0% (54/71) foram identificadas como sendo *Ureaplasma parvum*, 12,7% (9/71) como *Ureaplasma urealyticum* e co-infecção entre os biotipos em 11,3% (8/71) das amostras.

Para *Ureaplasma parvum*, a sorotipagem mostrou uma positividade de: 7,4% (4/54) para o sorotipo 1; 25,9% (14/54) para o sorotipo 6; 35,2% (19/ 54) para os sorotipos 3/14. Também na sorotipagem observou-se co-infecção entre os sorotipos, onde 11,1% (6/54) foram positivas para sorotipo 1 e 6; 5,6% (3/54) para sorotipos 1 e 3/14; e 14,8% (8/54) para os sorotipos 6 e 3/14. Estes dados são coerentes com outros estudos, onde o sorotipo 3 e 6 são mais frequentemente encontrados participando de doenças do trato genital feminino (NAESSENS *et al.*, 1988; ROBERTSON *et al.*, 1986; ZHENG *et al.*, 1992).

Todas as 17 amostras positivas identificadas pela biotipagem como sendo *Ureaplasma urealyticum* foram subtipadas. Dentre estas: 6 foram identificadas como somente subtipo 2; 5 como sendo subtipo 1/3. Foram também encontrados casos de co-infecção para 2 amostras como subtipos 1/3 e 2; 3 amostras foram identificadas como subtipos 1/3 e 3 e apenas 1 amostra foi subtipo 2 e 3. Estes resultados são inéditos, em virtude de não haver ainda trabalhos na literatura que identificam tais subtipos por PCR em gestantes. Em pacientes femininas com queixas de cervicites (CRACEA *et al.*, 1984; ROBERTSON *et al.*, 1986) alguns trabalhos atribuem uma maior patogenicidade aos "sorotipos" IV, VIII e X.

Nas cepas de micoplasmas isolados foi verificado ainda a existência do plasmídeo "*tetM*" responsável pela resistência bacteriana à tetraciclina. Segundo SALYERS *et al.* (1990), a resistência à tetraciclina nas bactérias em geral é codificada por vários determinantes genéticos especialmente em micoplasmas, entretanto até o momento somente o determinante tetraciclina resistente "*tetM*" foi descrito (ROBERTS & KENNY, 1986). As tetraciclinas e seus derivados são os antibióticos de eleição para o tratamento das micoplasmoses e tem sido observado um aumento na

freqüência da resistência de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* contra estas drogas (BLANCHARD *et al.*, 1992). A detecção do plasmídeo de resistência "tetM" em todas as amostras positivas para *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma spp.* mostrou positividade em 4/11 (36,4%) para os casos de *Mycoplasma spp.* e 42/71 (59,2%) para *Ureaplasma spp.* Entre estas, 33/54 (61,1%) foram positivas para *Ureaplasma parvum*; 4/9 (44,4%) para *Ureaplasma urealyticum*; 5/8 (62,5%) para co-infecção de *U. parvum* x *U. urealyticum*. A detecção do "tetM" torna-se importante na avaliação do tratamento a ser empregado.

Este trabalho demonstrou a presença de *M. penetrans*, *M. fermentans*, *M. genitalium* em material cervical de gestantes, podendo ser extremamente significativa, tanto do ponto de vista clínico como epidemiológico considerando-se uma possível transmissão sexual (DINSMOOR *et al.*, 1989; SANCHEZ *et al.*, 1990; MONTORO, A.S., 1992). Tanto quanto as espécies do gênero *Ureaplasma spp.* e *Mycoplasma hominis*, cuja participação é comprovada em alterações perigestacionais, quanto as outras espécies de micoplasmas detectadas nas gestantes, podem também estar implicadas na patogenicidade. Este trabalho contribuiu para evidenciar a presença destes microrganismos em gestantes, presença esta ainda pouco valorizada no país, mas com inegável importância conforme várias publicações internacionais.

---

## **REFERÊNCIAS**

---

## 6- REFERÊNCIAS

- ABELE-HORN, M., WOLF, C., DRESSEL, P., PAFF, F., ZIMMERMANN, A. Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. J. Clin. Microbiol. Washington, vol.35, n.5, p.1199-1202, 1997.
- ABIVEN, P., BLANCHARD, B., SAILLARD, C., KOBISCH, M., BOVE, J.M. A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experiment infected piglets. Mol Cell Probes. London, vol.6, n.5, p.423-429, 1992.
- AINSWORTH, J.G., KATSENI, V., HOURSHID, S., WALDRON, S., BALL, S., CATTELL, V., TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma fermentans* and HIV-associated nephropathy. J. Infect. London, v.29, n.3, p.323-326, 1994.
- ALFA, M.J., EMBREE, J.E., DEGAGNE, P., OLSON, N., LERTZMAN, J., MACDONALD, K.S., MACDONALD, N.T., HALL, P.F. Transmission of *Ureaplasma urealyticum* from mothers to full and preterm infants. Pediat. Infect. Dis. J. Baltimore, v.14, n.5, p.341-345, 1995.
- 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, v.20, p.35-58, 1970.

BARBEYRAC, B., BERNET-POGGI, C., FEBRER, F., RENAUDIN, H., DUPON, M., BÉBÉAR, C. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polimerase chain reaction. Clin. Infect. Dis. Chicago, Suppl.1, v.17, p.583-589, 1993.

BARBEYRAC, B., BÉBÉAR, C., TAYLOR-ROBINSON, D. PCR: preparation of DNA from clinical specimens. In: TULLY, J.G., RAZIN, S. Mol. Diag. Proc. Mycoplasm. Diagnostic procedures. San Diego: Academic Press. v.2, p.61-64, 1996.

BAUER, F.A., WEAR, D.J., ANGRITT, P., LO SC. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) infection in the kidneys of acquired immunodeficiency syndrome and associated nephropathy: a microscopic, immunohistochemical, and ultrastructural study. Hum. Pathol. New York, v.22, n.1, p.63-69, 1991.

BAUER, H.N. Genital human papilloma virus infection in universit students is determineted PCR-based methods. J. Am. Med. Assoc. New York, v.265, n.4, p.472-477, 1991.

BEHBAHANI, N., BLANCHARD, A., CASSEL, G.H., MONTAGNIER, L. Phylogenetic analysis of *Mycoplasma penetrans*, isolated from HIV-infected patients. FEMS Microbiol. Amsterdam, v.109, p.63-66, 1993.

BENDJENNAT, M., BLANCHARD, A., LOUTFI, M., MONTAGNIER, L., BAHRAOUT, E. Purification and characterization of *Mycoplasma penetrans* Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> - dependent endonuclease. J. Bacteriol. Washington, vol.179, n.7, p.2210-20, 1997.

BLANCHARD, A. Sequencing of *Ureaplasma urealyticum* urease genes: use of a UGA tryptophan codon. Mol. Microbiol. Oxford, v.4, p.669, 1990.

---

BLANCHARD, A., CRAB, D.M., DYBVIG, K., DUFFY, L.B., CASSELL, G.H. Rapid detection of *tetM* in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR: *tetM* confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline. FEMS Microbiol. Letters. Amsterdam, v.95, p.277-282, 1992.

BRENNER, C., WRÓBLEWSKI, H., LE HENAFF, M., MONTAGNIER, L., BLANCHARD, A. Spiralin a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces T-cell-independent B-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. Infect. Immun. Washington, v.65, n.10, p.4322-29, 1997.

BROWN, M.B., CASSELL, G.H., McCORMACK, W.M. Measurement of antibody to *Mycoplasma hominis* by an enzyme-linked immunoassay and detection of class-specific antibody responses in women with postpartum fever. Am. J. Obstet. Gynecol. St. Louis, v.56, p.701-708, 1987.

BRUS, F., WAARDE, W.M., SCHOOTS, C., OETOMO, B.S. Fatal Ureaplasma pneumonia and sepsis in a newborn infant. Eur. J. Pediat. Berlin, v.150, p.782-783, 1991.

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

CASSEL, G.H., YANEZ, A., DUFFY, L.B. Detection of *Mycoplasma fermentans* in the respiratory tract of children with pneumonia. In: IOM Letters. Programme and abstracts of the 10<sup>th</sup> International Congress of the International Organisation for Mycoplasmaology, Bourdeaux, v.3, p.456, 1994.

---

- CASSEL, G.H., WAITES, K.B., CROUSE, M.D. Mycoplasmal infection. In: REMINGTON, J.S., KLEIN, J.O. Infection Diseases of the Fetus and Newborn Infants. Philadelphia: W.B. Saunders Company, Cap.14, 4ed, p.619-655, 1995.
- CASSEL, G.H., WAITES, K.B., TAYLOR-ROBINSON, D. Micoplasmas Genitais. In: MORSE, S.A., MORELAND, A.A., HOLMES, K.K. Atlas de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. São Paulo: Artes Médicas, England: Mosby-Wolfe, 1996. Cap.7, 2ed, p.120-132, 1997.
- CHRISTIANSEN, C., BLACK, F.T., FEUNDT, E.A. Hybridization experiments with deoxyribonucleic acid from *Ureaplasma urealyticum* serovars I to VIII. Int. J. Syst. Bacteriol. Washington, v.31, p.259-262, 1981.
- CROUSE, D.T., ENGLISH, B.K., LIVINGSTON, L., MEALS, E.A. Genital mycoplasmas stimulate tumor necrosis factor- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase production from a murine macrophage cell line. Pediat. Res. Baltimore, v.44, n.5, p.785-90, 1998.
- CUNHA, R.A.F., KOIFFMAN, C.P., SOUZA, D.H., TAKEI, K. Clastogenic effects of different *Ureaplasma urealyticum* serovars on human chromosomes. Braz. J. Med. Biol. Res. Ribeirão Preto, v.30, n.6, p.749-757, 1997.
- CUNHA, R.A.F. Infecções por Micoplasmas. In: FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.16, p.186-194, 2ed, 443p., 2001.

- DAVIS, J.W., VILLANUEVA, I. Enzyme differences in serovar clusters of *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma diversum*, and ovine ureaplasmas. Zentrbl. Bakteriol. Stuttgart, Suppl.20, p.661-665, 1990.
- DEGUCHI, T., GILROY, C.B., TAYLOR-ROBINSON, D. Failure to detect *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma penetrans* and *Mycoplasma pirum* in the urethra of patients with acute nongonococcal urethritis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Wiesbaden, v.15, p.169-171, 1996.
- DE SILVA, N.S., QUINN, P.A. Localization of endogenous activity of phospholipases A and C in *Ureaplasma urealyticum*. J. Clin. Microbiol. Washington, v.29, p.1498-1503, 1991.
- DIENES, L., EDSALL, G. Observation on the L-organism of Klienenger. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. New York, v.36, p.740-744, 1937.
- DITTY, S.E., CONNOLLY, M.A., LI, B.J., LO, S-C. *Mycoplasma orale* has a sequence similar to the insertion-like sequence of *Mycoplasma fermentans*. Mol. Cel. Probes. London, v.13, p.183-89, 1999.
- DRISCOLL S.G, KUNDSIN R.B, HORNE H.W., SCOTT J.M. Infections and first trimester losses: possible role of Mycoplasmas. Fert. Steril. Birmingham, v.20, n.6, p.1017-1019, 1969.
- DUFFY, L.B, CRABB, D., SEARCEY, K., KEMPF, M.C. Comparative potency of gemifloxacin, new quinolones, macrolides, tetracycline and clindamycin against *Mycoplasma* spp. J. Antim. Chem. Oxford, Suppl.1, v.45, p.29-33, 2000.



- DUSSURGET, O., HENRY, A., LEMERCIER, B., ROULLAND-DUSSOIX, D. Polymerase chain reaction-based diagnosis of mollicute infection of commercial animal sera. J. Microbiol. Methods. Amsterdam, v.20, p.125-135, 1994.
- ECHAHIDI, F., MUYLDERMANS, G., LAUWERS, S., NAESSENS, A. Development of monoclonal antibodies against *Ureaplasma urealyticum* serotypes and their use for serotyping clinical isolates. Clin. Diagn. Lab. Immunol. Washington, v.7, n.4, p.563-67, 2000.
- EDWARD, D.G., FREUND, E.A. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. J. Gen. Microbiol. Colchester, v.14, p.197-207, 1967.
- ELSHIBLY, S., KALLINGS, I., HELLBERG, D., MARDH, P.A. Sexual risk behaviour in women carries of *Mycoplasma hominis*. Brit. J. Obst. Gynaecol. Oxford, v.103, p.1124-1128, 1996.
- FRANZOSO, G., DIMITROV, D.S., BLUMENTHAL, R., BARILE, M.F., ROTTEM, S. Fusion of *Mycoplasma fermentans* strain incognitus with T-lymphocytes. FEBS Lett. Amsterdam, v.303, p.251-254, 1992.
- GALLILY, R., SALMAN, M., TARSHIS, M., ROTTEM, S. *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain) induces TNF- $\alpha$  and IL-1 production by human monocytes and murine macrophages. Immun. Lett. Amsterdam, v.34, p.27-30, 1992.
- GELFAND, E.W. Unique susceptibility of patients with antibody deficiency to mycoplasma infection. Clin. Infect. Dis. Chicago, Suppl.1, v.17, p.S250-S253, 1993.

- GIRÓN, J.A., LANGE, M., BASEMAN, J.B. Adherence, fibronectin binding and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. Infect. Immun. Washington, v.64, n.1, p.197-208, 1996.
- GLASS, J.I., LEFKOWITZ, E.J., GLASS, J.S., HEINER, C.R., CHEN, E.Y., CASSEL, G.H. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. NATURE. London, v.407, p.757-762, 2000.
- GÖHLMANN, H.W.H., WEINER, J.III, SCHON, A., HERRMANN, R. Identification of a small RNA within the *pdh* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. J. Bacteriol. Washington, v.182, n.11, p.3281-3284, 2000.
- GRAU, O., REMI, K., GRIFFAIS, R., LAUNAY, V., MONTAIGNER, L. Development of PCR-based assays for the detection of two human mollicute species, *Mycoplasma penetrans* and *M.hominis*. Mol. Cel. Probes. London, v.8, p.139-148, 1994.
- HANNAN, P.C.T., WOODNUTT, G. *In vitro* activity of gemifloxacin (SB 265805, LB 20304a) against human mycoplasmas. J. Antimicrob. Chemother. Oxford, v.45, p.367-69, 2000.
- HAY, P.E., MORGAN, D.J., ISON, C.A. A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy. Br. J. Obstetr. Gynaecol. Oxford, v.101, p.1048-1053, 1994.
- HEGGIE, A.D., JACOBS, M.R., BUTLER, V.T., BAILEY, J.E., BOXERBAUM, B. Frequency and significance of isolation of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* from cerebrospinal fluid and tracheal aspirate

- specimens from low weight infants. J. Pediat. St. Louis, v.24, n.6, p.956-961, 1994.
- HENRY-SUCHET, J., CATALAN, F., LOFFREDO, V. Microbiology of specimens obtained by laparoscopy from controls and from patients with pelvic inflammatory disease or infertility with tubal obstruction. *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*. Am. J. Obstet. Gynecol. St. Louis, v.138, p.1022, 1980.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY – SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMY OF MOLLICUTES: Revised minimum standards for description of new species of the class *Mollicutes* (divison *Tenericutes*). Int. J. Syst. Bacteriol. Washington, v.45, p.605-612, 1995.
- IYAMA, K., ONO, S., KUWANO, K., OHISHI, M., SHIGUEMATSU, H., ARAI, S. Induction of tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) and enhancement of HIV-1 replication in the J22HL60 cell line by *Mycoplasma penetrans*. Microbiol. Immun. Tokyo, v.40, p.907-914, 1996.
- JACOBS, E. Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections: critical review of current procedures. Clin. Infect. Dis. Chicago, Suppl.1, v.17, p.S79-S80, 1993.
- JENSEN, J.S., ULDUM, S.A., ANDERSEN, S., VUUST, J., LIND, K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. J. Clin. Microbiol. Washington, v.1, p.46-50, 1991.
- KOCH, A., BILINA, A., TEODOROWICZ, L., STARY, A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. Wien. Klin. Woch. Wien, v.109, n.14-15, p.584-85, 1997.

- KILIAN, M. Immunoglobulin A1 protease activity in strains of *Ureaplasma urealyticum*. ACTA Pathol. Microbiol. Scand. Sect.B: Microbiol. Copenhagen, v.92, p.61-64, 1984.
- KONG, F., ZHU, X., WANG, W., ZHOU, X., GORDON, S., GILBERT, G.L. Comparative analysis and serovar-specific identification of multiple-banded antigen gene of *Ureaplasma urealyticum* Biovar 1. J. Clin. Microbiol. Washington, v.37, n.3, p.538-543, 1999.
- KONG, F., ZHENFANG, M.A., GREGORY, J., GORDON, S., GILBERT, G.L. Species Identification and Subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* Using PCR-Based Assays. J. Clin. Microbiol. Washington, v.38, n.3, p.1175-1179, 2000.
- KUNDSIN, R., LEVITON, A., ALLRED, E., POULIN, S.A. *Ureaplasma urealyticum* infection of the placenta in pregnancies that ended prematurely. Obstet. Gynecol. New York, v.87, n.1, p.122-127, 1996.
- LADEFOGED, S. Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*. APMIS. Copenhagen, Suppl.97, v.108, p.5-45, 2000.
- LEMCKE, R.M. A serological comparison of various species of mycoplasma by na agar gel double diffusion technique. J. Gen. Microbiol. Colchester, v.38, p.91-100, 1965.
- LO, S-C., SHIH, J.W.K., YANG, N.Y., OU, C.Y., WANG, Y.H. A novel virus-like infectious agent in patients with AIDS. Am. J. Trop. Med. Hyg. Baltimore, v.40, p.213-226, 1989a
- LO, S-C., DAWSON, M.S., WONG, D.M., NEWTON, I.P.B., SONODA, M.A., ENGLER, W.F. Identification of *Mycoplasma incognitus* infection in patients
-

with AIDS: an immunohistochemical, *in situ* hibridization and ultrastructural study. Am. J. Trop. Med. Hyg. Baltimore, v.41, p.601-616, 1989b.

LO, S-C., HAYES, M.M., PIERCE, P.F., KOTANI, H., SHIH, J.W.K., WANG, Y.H.LO. Newly discovered mycoplasma isolated from patients with HIV. Lancet. London, v.338, p.1415-1418, 1991a.

LO, S-C., TSAI, S., BENISH, J.R., SHIH, J.W.K., WEAR, D.J., WONG, D.M. Enhancement of HIV-1 cytotoxic effects in CD4+ lymphocytes by the AIDS associated mycoplasma. Science. Washington, v.251, p.1074-1076, 1991b.

LO, S.C., HAYES, M.M., PIERCE, P.F., KOTANI, H., SHIH, J.W.K., WANG, Y.H., TULLY, J.G., ROSE, D.L. *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. Int. J. Syst. Bacteriol. Washington, v.42,n.3, p.357-364, 1992.

LO, S.C., HAYES, M.M., KOTANI, H., PIERCE, P.F., WEAR, D.J., NEWTON, P.B., TULLY, J.G., SHIH, J.W.K. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasma penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. Mod. Pathol. Baltimore, v.6, n.3, p.276-280, 1993.

MARTINELLI, F., GARRAFA, E., TURANO, A., CARUSO, A. Increased frequency of detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in AIDS patients without urethral symptoms. J. Clin. Microbiol. Washington, v.37, n.6, p.2042-2044, 1999.

McDONALD, H.M., O'LOUGHLIN, J.A., JOLLEY, P., VIGNESWARAN, R., McDONALD, P.J. Prenatal microbiological risk factors associated with preterm birth. Br. J. Obstet. Gynaecol. Oxford, v.99, p.190-196, 1992.

---

- MIYATA, M., SETO, S. Cell reproduction cycle of mycoplasma. Biochimie. Paris, v.81, p.873-878, 1999.
- MOLLER, B.R., TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P.M. Serological evidence implicating *Mycoplasma genitalium* in pelvic inflammatory disease. Lancet. London, v.1, p.1102-1103, 1984.
- MONTAGNIER L., BLANCHARD, A. Mycoplasmas as cofactor in infection due to the human immunodeficiency virus. Clin. Infect. Dis. Chicago, Suppl.1, v.17, p.S309-S315, 1993.
- NEYROLLES, O., BRENNER, C., PREVOST, M-C., FONTAINE, T., MONTAGNIER, L., BLANCHARD, A. Identification of two glycosylated components of *Mycoplasma penetrans*: a surface-exposed capsular polysaccharide and a glycolipid fraction. Microbiol. Washington, v.144, p.1247-1255, 1998.
- NOCARD & ROUX. Le microbe de la péripneumonie. Ann. Institut. Pasteur. Paris, v.12, p.240-62, 1898.
- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reation in gels. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect.B: Microbiol. Copenhagen, v.26, p.507-15, 1949.
- PALMER, H.M., GILROY, C.B., FURR, P.M., TAYLOR-ROBINSON, D. Development and evalution of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. FEMS Microbiol. Lett. Amsterdam, v.77, p.199-204, 1991.
-

POLLACK, J.D, WILLIAMS, M.V, MCELHANEY, R.N. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. Crit. Rev. Microbiol. Boca Raton, Flórida, v.23, n.4, p.269-354, 1997.

RAZIN, S., FREUNDT, E.A. The mycoplasmas. In: BERGEY's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore, Willians & Wilkins, v.1, p.740-93, 1984.

RAZIN, S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). Microbiol. Rev. Washington, v. 49, n.4, p.419-455, 1985.

Razin, S., YOGEV, D., NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Washington, v.62, n.4, p.1094-1156, 1998.

ROBERTSON, J., HOWARD, L.A., ZINNER, C.L., STEMKE, G.W. Comparison of 16S rRNA genes within the T960 and parvo biovars of *Ureaplasmas* isolated from humans. Int. J. Syst. Bacteriol. Washington, v.44, n.4, p.836-888, 1994.

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

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

- SASAKI, Y., HONDA, M., NAITOU, M., SASAKI, T. Detection of *Mycoplasma fermentans* DNA from lymphonodes of acquired immunodeficiency syndrome patients. Microb. Pathog. London, v.17, p.131-135, 1994.
- SHAEVERBEKE, T., GILROY, C.B., BÉBÉAR, C., DEHAIS, J., TAYLOR-ROBINSON, D. *Mycoplasma fermentans* in joints of patients with rheumatoid arthritis and other joint disorders. Lancet. London, v.347, p.1418, 1996.
- SHEPARD, M.C. The recovery of pleuropneumonia-like organism from negro men with and without non-gonococcal urethritis. Am. J. Syph., Gonorrhea, Vener. Dis. St. Louis, v.38, p.113-124, 1954.
- SHEPARD, M.C. Standard fluid medium U10 for cultivation and maintenance of *Ureaplasma urealyticum*. Int. J. Syst. Bacteriol. Washington, v.24, p.160-171, 1974.
- SHEPARD, M.C., LUCEFORD, C.D. Diferencial agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T Mycoplasma) in primary culture of clinical material. J. Clin. Microbiol. Washington, v.3, n.6, p.613-625, 1976.
- SHIBATA, K.T., KAGA, M., LI DONG, M.K., HASEBE, A., SATO, H.D.Y., OGUCHI, H., WATANABE, T. Detection of *Mycoplasma fermentans* in saliva sampled from infants, preschool and school children, adolescents and adults by polymerase chain reaction-based assay. Microbiol. Immun. Tokyo, v.43, n.6, p.521-525, 1999.
- STÄDTLANDER, C.T.K-H., ZUHUA, C., WATSON, H.L., CASSEL, G.H. Protein and antigen heterogeneity among strains of *Mycoplasma fermentans*. Infect. Immun. Washington, v.59, n.9, p.3319-3322, 1991.



- STYLER, M., SHAPIRO, S.S. Mollicutes (mycoplasma) in infertility. Fertil. Steril. Birmingham, v.44, n.1, p.1-12, 1985.
- SWENSON, C.E., VANTTAMONT, J., DUNBAR, B.S. Specific protein differences between strains of *Ureaplasma urealyticum* as determined by two-dimensional gel electrophoresis and a sensitive silver stain. Int. J. Syst. Bacteriol. Washington, v.33, p.417-421, 1983.
- TAYLOR-ROBINSON, D., PURCELL, R.H., WONG, D.C., CHANOCK, R.M. A color test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based upon the inhibition of acid production. J. Hyg. Cambridge, v.64, p.91-104, 1966.
- TAYLOR-ROBINSON, D; FURR, P.M. Clinical antibiotic resistance of *Ureaplasma urealyticum*. Pediat. Infect. Dis. J. Baltimore, v.5, p.5335-5337, 1986.
- TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P.M., TULLY, J.G. Animal models of *Mycoplasma genitalium* urogenital infections. Isr. J. Med. Sci. Israel, v.23, p.561-564, 1987.
- TAYLOR-ROBINSON, D., MUNDAY, P.E. Mycoplasmal infection of the female genital tract and its complications. In: HARE, M.J., ed. Gen. Infect. Women. Edinburg: Churchil Livingstone, p.228-247, 1988.
- TAYLOR-ROBINSON, D. Intracelular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immnocytochemistry and electron microscopy. Int. J. Exp. Pathol. Oxford, v.72, p.705, 1991.

- TAYLOR-ROBINSON, D. The Harrinson Lecture. The history and role of *Mycoplasma genitalium* in sexually transmited diseases. Genitourin. Med. London, v.71, p.1-8, 1995.
- TAYLOR-ROBINSON, D. Infection due to *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: An update. Clin. Infect. Dis. Chicago, v.23, p.671-684, 1996a.
- TAYLOR-ROBINSON, D. Diagnosis of sexually transmitted diseases. In: TULLY, J. G., RAZIN, S. Mol. Diagn. Proc. Mycoplasm. San Diego: Academic Press, v.2, p.225-236, 1996b.
- TAYLOR-ROBINSON, D. Genital mycoplasma infectious. Wien. Klin. Woch. Wien, v.109, n.14-15, p.578-583, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON D, BEBEAR C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. J. Antimicrob. Chemother. Oxford, v.40, n.5, p.622-630, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P. Genital mycoplasma infection. Wien. Klin. Woch. Wien, v.109, n.14-15, p.578-583, 1997.
- TAYLOR-ROBINSON, D., FURR, P.M. Observation on the antibiotic treatment of experimental induced mycoplasmal infections in mice. J. Antimicrob. Chemother. Oxford, v.45, p.903-907, 2000.
- TEICHMAM, S.S., PARK, J., CHOTHIA, C. Structural assignments to the *Mycoplasma genitalium* proteins show extensive gene duplication and domain rearrangements. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Washington, v.95, p.14658-14663, 1998.

- TENG, L.J., ZHENG, X., GLASS, J.I., WATSON, H.L., TSAI, J., CASSEL, G.H. *Ureaplasma urealyticum* biovar specificity and diversity are encoded in multiple-banded antigen gene. J. Clin. Microbiol. Washington, v.6, p.1464-1469, 1994a.
- TENG, K., LI, M., YU, M., LI, H., SHEN, D., LIU, D. Comparison of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from patients with urogenital infections. J. Clin. Microbiol. Washington, v.9, p.2232-2234, 1994b.
- TULLY, J.G., TAYLOR-ROBINSON, D., COLE, R.M., ROSE, D.L. A new discovered mycoplasma in the human urogenital tract. Lancet. London, v.1, p.1288-1291, 1981.
- TULLY, J.G., TAYLOR-ROBINSON, D., ROSE, D.L. Urogenital challenge of primates species with *Mycoplasma genitalium* and characteristics of infection induced in chimpanzees. J. Infect. Dis. Chicago, v.153, p.1046-1054, 1986.
- TRUM, J.W., PANNEKOEK, Y., SPANJAARD, L., BLEKER, O.P., VAN DER VEEN, F. Accurate detection of male subclinical genital tract infection via cervical culture and DNA hybridization assay of the female partner. Internat. J. Androl. Oxford, v.23, p.43-45, 2000.
- UNO, M., DEGUCHI, T., KOMEDA, H., HAYASAKI, M., ILDA, M., NAGATANI, M., KAWADA, Y. *Mycoplasma genitalium* in the cervixes of Japanese women. Sex. Transm. Dis. Philadelphia, v.24, n.5, p.284-286, 1997.
- VAN KUPPEVELD, F.J.M., VAN DER LOGT, J.T.M., ANGULO, A.F., VAN ZOEST, M.J., QUINT, W.G.V., NIESTERS, H.G.M., GALAMA, J.M.D., MELCHERS, W.J.G. Genus- and species-specific identification of

- mycoplasma by 16S rRNA amplification. Appl. Environ. Microbiol. Washington, v.58, p.2606-2615, 1992.
- VELLECA, W.M., BIRD, B.R., FORRESTER, F.T. Arginine broth medium for growth of *Mycoplasma hominis*. In: Lab. Diagn. Mycopl. Infect. Atlanta, U.S. Department of Health, Education and Welfare, C.D.C., p.120, 1979.
- YANEZ, A, CEDILLO, L, NEYROLLES, O, ALONSO, E, PREVOST, M.C, ROJAS, J, WATSON, H.L, BLANCHARD, A, CASSELL, G.H. Mycoplasma penetrans bacteremia and primary antiphospholipid syndrome. Emerging Infect. Dis. Atlanta, v.5, n.1, p.164-7, 1999.
- WAITES, K.B., DUFFY, L.B., SCHIMID, T. *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* to investigational quinolones, sparfloxacin and PD 127391. Antimicrob. Agents Chemother. Washington, v.35, p.1181-1185, 1991.
- WAITES, K.B., CROUSE, D.T., CASSELL, G.H. Systemic neonatal infection due to *Ureaplasma urealyticum*. Clin. Infect. Dis. Chicago, Suppl.1, v.17, p.S131-S135, 1993.
- WANG, R.Y.H., SHIH, J.W.K., GRANDINETTI, T., PIERCE, P.F., HAYES, M.M., WEAR, D., ALTER, H.J., LO, S-C. High frequency of antibodies to *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected patients. Lancet. London, v.340, p.1312-1316, 1992.
- WASINGER, V.C., POLLACK, J.D., SMITH, L.H. The protome of *Mycoplasma genitalium* (chaps-soluble component). Eur. J. Biochem. Oxford, v.267, p.1571-1582, 2000.

- WOESE, C.R, MANILOFF, J, ZABLEN, L.B. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Washington, v.77, n.1, p.494-498, 1980.
- ZENG, X., TENG, L-J., WATSON, H.L., GLASS, J.I., BLANCHARD, A., CASSEL, G.H. Small repeating units within the *Ureaplasma urealyticum* MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. Infect. Immun. Washington, v.63, n.3, p.891-898, 1995.

**ANEXOS**

---

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

Projeto de Pesquisa: "Detecção das espécies emergentes: *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma fermentans* em gestantes através de técnicas de cultivo e de biologia molecular."

Este projeto visa determinar a prevalência destas espécies emergentes de micoplasmas em gestantes nas várias idades gestacionais. O estudo desta prevalência constitui-se objeto de grande interesse para se obter maiores informações sobre o papel desses microorganismos nas complicações em gestantes e as consequências da infecção materna sobre o desenvolvimento fetal.

O envolvimento de espécies como *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* em casos de infertilidade e alterações perigestacionais, tais como: abortos espontâneos, nascimentos de natimortos e prematuros e nascidos com baixo peso, entre outras, tem sido relatados por alguns autores. Considerando-se dados recentes da literatura reportando a existência de *M. penetrans*, *M. genitalium* e *M. fermentans* em nossa população masculina, este trabalho vem em encontro com nossas expectativas em determinar a prevalência destas espécies em gestantes.

Este estudo será realizado em conjunto com o Serviço do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As amostras de material cervical (para realização das culturas e PCR) das gestantes serão colhidas no momento em que a paciente for realizar os exames ginecológicos solicitados pelo médico, não havendo nenhum prejuízo ou desconforto a mesma.

A participação será voluntária e os resultados serão encaminhados aos médicos do Serviço de Obstetrícia e Ginecologia.

Todo material utilizado na coleta das amostras será estéril, não havendo, portanto, risco de contaminação.

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

Nome:.....

Endereço:.....

RG:.....Data:.....

Assinatura do participante:.....

Assinatura do Médico responsável do Setor:.....

**ANEXO 02****1- MEIOS DE CULTURA:****•meio de transporte A<sub>3</sub>xb (SHEPARD, 1976, mod.)**

Tryptic Soy Broth (DIFCO).....	3.0 g
Cloridrato de L-cisteína 4%.....	0.25 ml
Água bidestilada .....	98 ml

→ O meio foi autoclavado à 120°C por 20 minutos, e após ser resfriado, foi suplementado de forma estéril com:

Fração de soro PPLO .....	1.0 ml
Anfotericina B .....	2.5 ug/ml
Penicilina G .....	1.000 UI/ml

**•meio líquido U10 (SHEPARD 1974, mod)**

PPLO broth .....	47 g
Água bidestilada .....	70 ml

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

Soro estéril e inativado de cavalo .....	20 ml
Extrato fresco de levedura 25% .....	10 ml
Cloridrato de L-cisteína 2% .....	0.5 ml
Uréia 10% .....	0.5 ml
Suplemento VX .....	1.0 ml
Penicilina G .....	1.000 UI/ml
Vermelho de fenol 1% .....	0.1 ml
Suplemento GHL .....	0.1 ml



•meio líquido de Arginina (VELLECA 1979, mod.)

PPLO broth ..... 1.4 ml

Água bidestilada ..... 70 ml

→ O pH do meio foi ajustado para 7.5. O meio foi autoclavado à 120°C por 20 minutos, e após ser resfriado, foi suplementado de forma estéril com:

Soro estéril e inativado de cavalo ..... 20 ml

Extrato fresco de levedura 25% ..... 10 ml

Suplemento VX ..... 1.0 ml

Vermelho de fenol 0.4% ..... 0.3 ml

Penicilina G ..... 1.000 UI/ml

Arginina 30%..... 0.66 ml

•meio líquido para determinar a fermentação de glicose (ALUOTTO 1970)

Caldo de cérebro e coração..... 3.26 g

Água bidestilada ..... 58 ml

→ O pH do meio foi ajustado para 7.6. O meio foi autoclavado à 120°C por 20 minutos, e após ser resfriado, foi suplementado de forma estéril com:

Solução estéril de glicose 10% ..... 10 ml

Vermelho de fenol 1% ..... 0.5 ml

Soro fetal bovino ..... 12 ml

•meio líquido e sólido SP4 (TAYLOR ROBINSON 1996b, mod. )

PPLO broth ..... 0.35 ml

Triptona ..... 1.0 g

Bacto peptona ..... 0.53 g

Água destilada ..... 62 ml

→ O pH do meio foi ajustado para 7.6. O meio sólido foi obtido acrescentando-se 1 g de Ágar Noble (DIFCO). O meio foi autoclavado à 120°C por 20 minutos, e após ser resfriado, foi suplementado de forma estéril com:

Vermelho de fenol 1% .....	0.4 ml
Meio Fischer com bicarbonato .....	5.0 ml
Extrato fresco de levedura 25% .....	3,5 ml
Extrato de levedura dissecada 2% .....	10 ml
Soro fetal bovino .....	17 ml
Penicilina G potássica .....	1.000 UI/ml
Dextrose 50% .....	2.0 ml
Arginina 1% .....	1.0 ml

**•meio sólido A7 (SHEPARD 1976, mod.)**

PPLO broth .....	2.1ml
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O .....	0.0150 g
Água bidestilada .....	63 ml

→ O pH do meio foi ajustado para 5.5. Após ajuste do pH, foi adicionado 1 g de Ágar Noble. O meio foi autoclavado à 120°C por 20 minutos, e após ser resfriado, foi suplementado de forma estéril com:

Soro estéril e inativado de cavalo .....	20 ml
Extrato fresco de levedura 25% .....	10 ml
Uréia 10% .....	1.0 ml
Glicose 10% .....	5 ml
Suplemento VX .....	1.0 ml
Penicilina G .....	1.000 ml

**ANEXO 03**

**Tabela VIII:** Identificação dos "primers" utilizados como controles internos da reação na detecção de micoplasmas em gestantes.

<b>Controles Internos da Reação</b>	<b>Par de "primers"</b>	<b>Sequência de "primers"</b>	<b>Fragmento Amplificado (pb)</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
Gene da Globina	GLR 1	5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'	141	BAUER, et al. (1991)
	GLR 2	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'		
Plasmídeo pBR <sub>322</sub>	pBR 1	5'-CATCTCGGGCAGCGTTGGGT-3'	965	ABIVEN, et.al. (1992)
	pBR 6	5'-AGCGACGGGAGTCAGTGAGC-3'		

**ANEXO 04**

**Tabela IX:** Descrição dos pares de "primers" (seqüência, tamanho dos fragmentos amplificados) e suas respectivas enzimas de restrição (identificação e tamanho dos fragmentos amplificados), utilizado para determinação dos biotipos de *Ureaplasma* spp.; sorotipos de *Ureaplasma parvum* e subtipos de *Ureaplasma urealyticum* nas pacientes gestantes.

<b>Micoplasma</b>	<b>Par de "primers"</b>	<b>Seqüência de "primers"</b>	<b>Fragmento Amplificado (bp)</b>	<b>Enzima de Restrição</b>	<b>Tamanho dos Fragmentos (bp)</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<b>Biotipagem</b>						
<i>Ureaplasma</i> spp.	UMS 125	5- GATTTGCAATCTTATATGTTTTTCG -3'	448 e 403/404			KONG et al. (1999)
	UMA 226	5- CAGCTGATGTAAGTGACGACATTAATTC -3'				
<b>Sorotipagem</b>						
<i>Ureaplasma parvum</i> (sorotipo 3/14)	UMS 125	5- GATTTGCAATCTTATATGTTTTTCG -3'	442			KONG et al. (1999)
	UMS 269	5- CTAATGACCCTTTTCAAGTGTAAC -3'				
<i>Ureaplasma parvum</i> (sorotipo 1,6)	UMS 125	5- GATTTGCAATCTTATATGTTTTTCG -3'	442, 443	HinfI	(uncut, mixed, cut)	KONG et al. (1999)
	UMA 269'	5- CCAAATGACCCTTTTGTAACTAGAT -3'				

<i>Ureaplasma parvum</i> (sorotipo 6)	UMS 54	5'-CTTAGTGTCAIATTTTTACTAG-3'	369	KONG et al. (1999)
<b>Subtipagem</b>				
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 1/2)	UMA 269'	5'-CCAAATGACCCTTTGTAAGTAGAT-3'		
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 1/2)	UMS 61	5'-TTTGCAAACTATAAATAGACAC-3'	328	KONG et al. (2000)
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 3)	UMA 219	5'-GTAATTGCAACATGGAATTCAGCTTCG-3'		
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 3)	UMS 61	5'-TTTGCAAACTATAAATAGACAC-3'	328	KONG et al. (2000)
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 1/3)	UMA 219'	5'-GTAATTGCAACATGGAATTCAGCTTCA-3'		
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 1/3)	UMS 112	5'-GATTAACAACAAATCTTAATGTTGTTA-3'	356	KONG et al. (2000)
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 2)	UMA 194	5'-CGTTTAATGCTTTTTATCAITTTTCAG-3'		
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 2)	UMS 112'	5'-GATTAACAACAAATCTTAATGTTGTTG-3'	356	KONG et al. (2000)
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (subtipo 2)	UMA 194'	5'-CGTTTAATGCTTTTTATCAITTTTCAT-3'		

**ANEXO 05****Tabela X:** Tabela de todos os resultados encontrados na pesquisa de micoplasmas através da PCR.

<b>1- Gênero/ Espécie (individual)</b>	<b>Casos</b>	<b>%</b>
<i>M. penetrans</i>	2	2,3
<i>M. fermentans</i>	6	7,0
<i>M. hominis</i>	4	4,7
<i>Ureaplasma spp</i>	47	54,7
Co-infecções	27	31,3
<b>Total de casos</b>	<b>86</b>	<b>100</b>
<b>2- Co-infecções</b>	<b>Casos</b>	<b>%</b>
<i>M. penetrans x Ureaplasma spp</i>	1	3,7
<i>M. genitalium x Ureaplasma spp</i>	4	14,8
<i>M. fermentans x Ureaplasma spp</i>	9	33,3
<i>M. genitalium x M. fermentans</i>	3	11,1
<i>M. hominis x Ureaplasma spp</i>	5	18,6
<i>M. genitalium x M. fermentans x Ureaplasma spp</i>	3	11,1
<i>M. genitalium x M. hominis x Ureaplasma spp</i>	1	3,7
<i>M. fermentans x M. hominis x Ureaplasma spp</i>	1	3,7
<b>Total de casos</b>	<b>27</b>	<b>100</b>
<b>3- Detecção por PCR</b>	<b>Casos</b>	<b>%</b>
Casos positivos	86	73,5%
Casos negativos	31	26,5%
<b>Total de casos</b>	<b>117</b>	<b>100%</b>
<b>4- Casos positivos por PCR</b>		
<b>Todos os Gênero/ Espécie</b>	<b>Casos</b>	<b>%</b>
<i>M. penetrans</i>	2	2,3
<i>M. fermentans</i>	6	6,7
<i>M. hominis</i>	4	4,7
<i>Ureaplasma spp</i>	47	54,7
<i>M. penetrans x Ureaplasma spp</i>	1	1,2
<i>M. genitalium x Ureaplasma spp</i>	4	4,7
<i>M. fermentans x Ureaplasma spp</i>	9	10,5
<i>M. genitalium x M. fermentans</i>	3	3,5
<i>M. hominis x Ureaplasma spp</i>	5	5,8
<i>M. genitalium x M. fermentans x Ureaplasma spp</i>	3	3,5
<i>M. genitalium x M. hominis x Ureaplasma spp</i>	1	1,2
<i>M. fermentans x M. hominis x Ureaplasma spp</i>	1	1,2
<b>Total de casos</b>	<b>86</b>	<b>100</b>

---

<b>5- PCR na totalidade</b>	<b>Casos</b>	<b>%</b>
<i>M. penetrans</i>	2	1,71
<i>M. fermentans</i>	6	5,13
<i>M. hominis</i>	4	3,42
<i>Ureaplasma spp</i>	47	40,17
<i>M. penetrans x Ureaplasma spp</i>	1	0,86
<i>M. genitalium x Ureaplasma spp</i>	4	3,42
<i>M. fermentans x Ureaplasma spp</i>	9	7,69
<i>M. genitalium x M. fermentans</i>	3	2,56
<i>M. hominis x Ureaplasma spp</i>	5	4,27
<i>M. genitalium x M. fermentans x Ureaplasma spp</i>	3	2,56
<i>M. genitalium x M. hominis x Ureaplasma spp</i>	1	0,86
<i>M. fermentans x M. hominis x Ureaplasma spp</i>	1	0,86
casos negativos	31	26,49
<b>Total de casos</b>	<b>117</b>	<b>100</b>

---