



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



**SUSCEPTIBILIDADE DE *MYCOPLASMA HOMINIS* E *UREAPLASMA SP.*
A ANTIMICROBIANOS**

CECILIA DA CUNHA CAMILO

Orientador: Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos

Colaboradora: MSc. Rossicléia Lins Monte

Manaus-AM

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



CECILIA DA CUNHA CAMILO

**SUSCEPTIBILIDADE DE *MYCOPLASMA HOMINIS* E *UREAPLASMA SP.*
A ANTIMICROBIANOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos

Manaus-AM

2012

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C183s Camilo, Cacília da Cunha
susceptibilidade de Mycoplasma Hominis e Ureaplasma Sp. a
antimicrobianos / Cacília da Cunha Camilo. 2012
87 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Fernando Marques Barcellos
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Micoplasmas. 2. Ureaplasmas. 3. Resistência Antimicrobiana.
4. Agentes antimicrobianos. I. Barcellos, José Fernando Marques II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

CECILIA DA CUNHA CAMILO

SUSCEPTIBILIDADE DE *MYCOPLASMA HOMINIS* E *UREAPLASMA SP.*
A ANTIMICROBIANOS.

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Mestrado em sessão pública realizada em 05 de dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Professor Doutor José Fernando Marques Barcellos
Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Assinatura:

Examinador 2: Angélica Espinosa Barbosa Miranda

Assinatura:

Examinador 3: Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira

Assinatura:

Dedico a minha mãe, minha maior
incentivadora desde o início de
minha vida incluindo os difíceis
anos de vida acadêmica e
aos meus Filhos
Enzo Gabriel e Giulia Chiara
por darem sentido a todas as
minhas realizações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita misericórdia e bondade sem fim, a *ELE* toda Honra e Glória;

Ao meu Orientador Professor Doutor Jose Fernando Marques Barcellos pela paciência, dedicação e confiança em mim depositada, permitindo-me realizar este estudo em uma área que me apaixonou e para a qual pretendo contribuir.

Quero agradecer especialmente a Dra. Rossicléa Lins Monte pelo eterno incentivo e por se disponibilizar humildemente a dividir seus conhecimentos em todas as horas.

Aos professores que idealizaram o curso de mestrado em Imunologia Básica e Aplicada por terem lutado por este sonho e permitido que dele compartilhássemos e ao incentivo em todas as horas das professoras Aya Sadahiro e Maria Cristina Santos.

A toda a equipe do laboratório de bacteriologia da Fundação de Medicina tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, sobretudo aos colegas Felipe, Jeanne, Gabriela, Angelita, Michele, Pedro, Geraldo Magela e Carol Aniceto, pelo apoio no início deste projeto quando ainda era um projeto piloto e incentivo.

A amiga Patrícia Quincó, que sempre com muita paciência me auxiliou em diversas dificuldades e compartilhou de diversas ferramentas de pesquisa, se apresentando como uma grande companheira neste desafio.

A técnica Helen Machado do setor de bacteriologia dos laboratórios CDL e IPHM que com sua disponibilidade me auxiliou em diversas etapas deste estudo.

A Ana Lúcia Santos e Maria Selma Vidal que apoiaram incondicionalmente o desenvolvimento deste estudo nos laboratórios IPHM e CDL.

A todos os meus colegas do Laboratório do SPA Danilo Correa pelo ombro sempre pronto para o desabafo e pela amizade desinteressada.

As minhas colegas de mestrado Mônica e Maria José por dividirem as angústias e incentivarem-me a persistir e a todos os colegas do PPGIBA que me apoiaram e compartilharam sua amizade em momentos difíceis desta jornada.

Em especial quero agradecer aos meus familiares principalmente a minha mãe, uma grande guerreira e minha maior incentivadora que sempre me apoiou nos caminhos que trilhei, me ensinando a driblar os obstáculos, a não me deixar abater. Toda a minha gratidão e amor. Que Deus permita que ainda esteja muito tempo conosco.

Aos meus irmãos Pedro da Cunha Camilo, Ana Cláudia da Cunha Camilo e José da Paz da Cunha Camilo *in memoriam*, meus eternos companheiros.

A Marcus Di Fabianni um grande companheiro, que muitas vezes tornou esta empreitada mais leve, com sua companhia alegre, brincalhona, afetuosa e compreensiva e suas injeções de otimismo e motivação.

Por fim, quero agradecer a dois seres muito especiais: meu amado filho Enzo Gabriel, aquele que deu um sentido a minha vida, meu eterno norte, que mesmo distante esteve em todos os minutos em meus pensamentos, te amo filho... e a minha filha Giulia Chiara, minha grande companheira neste projeto, meu amor, minha fonte de perseverança, que me ensina a cada dia que ser diferente nos torna especiais; Quero dizer-lhe filha que sou muita grata pela sua paciência nas horas mais difíceis desta empreitada, em que você muitas vezes foi privada de minha companhia, de sair para atividades de lazer, festinhas, cinema, etc...simplesmente porque sua mãe precisava estudar...e você minha pequena senhorita, nunca reclamava, sempre tinha um sorriso alegre e compreensivo cheio de amor, a me motivar a continuar.

Epígrafe

“Para ser grande, sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha,
Porque alta vive.”

Fernando Pessoa

Resumo

Micoplasmas são microrganismos desprovidos de parede celular, com reduzida capacidade Biossintética, o que os torna extremamente fastidiosos ao crescimento. A resistência destes microrganismos aos agentes antimicrobianos utilizados na sua terapia como as tetraciclina, macrolídeos e quinolonas tem sido relatadas com frequência cada vez maior. A determinação da susceptibilidade a antimicrobianos é particularmente difícil porque não mostram turbidez em caldo o que dificulta a padronização do inóculo e são extremamente susceptíveis as condições de pH. A metodologia utilizada para este fim baseia-se na inibição metabólica utilizando substratos específicos. O presente trabalho avaliou a susceptibilidade de isolados de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. armazenados no período de 2011 a 2012. A metodologia utilizada englobou técnicas de cultura; para a estocagem e congelamento das cepas empregou-se caldo seletivo enriquecido PPLO e BHI, O descongelamento dos isolados foi sucedido de subcultivos em caldos enriquecidos seletivos diferenciais e Agar A7 para caracterização fenotípica. A quantificação, a identificação e o teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada através do sistema de triagem *Mycofast® Screening Evolution (Elitech Group)*, cuja identificação se baseia na susceptibilidade bacteriana pelo sistema *Identibiotiqué*. A susceptibilidade dos isolados foi determinada frente aos antimicrobianos doxiciclina 8 µg/ml, roxitromicina 4 µg/ml e ofloxacina 4 µg/ml, amplamente utilizados no tratamento empírico de pacientes com infecções do trato urogenital. Nosso estudo detectou alto nível de resistência dos isolados armazenados para doxiciclina e ofloxacina. Este é o primeiro estudo envolvendo isolamento e o perfil de susceptibilidade destes agentes realizado na região norte.

Palavras-chave: Micoplasmas, Ureaplasmas, Resistência Antimicrobiana de Micoplasmas

Abstract

Mycoplasmas are microorganisms lacking cell walls with reduced ability Biosintética, which makes them extremely fastidious growth. The strength of these microorganisms to antimicrobials used in his therapy as tetracyclines, macrolides and quinolones have been reported with increased frequency. The determination of antimicrobial susceptibility is particularly difficult because not shown in broth turbidity which complicates the standardization of the inoculum and are extremely susceptible pH conditions. The method most commonly used for this purpose is based on metabolic inhibition using specific substrates. This study evaluated the susceptibility of isolates of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* sp. stored in the period from 2011 to 2012. The methodology used for the isolation comprised culture techniques, for storage and freezing of the strains we used selective broth enriched PPLO and BHI, Thawing of isolates was succeeded subculture in broth enriched selective and differential agar A7 for phenotypic characterization. Quantification, identification and antimicrobial susceptibility testing was performed using the the triage system *Mycofast Evolution*® *Screening (Elitech Group)*, whose identification is based on bacterial susceptibility by Identibiotiqué system. The susceptibility of the isolates was determined against antimicrobial agents Doxiciclina 8 µg/ml, Roxitromicina 4 µg/ml and Ofloxacina 4 µg/ml, widely used in the empirical treatment of patients with urogenital tract infections. Our study showed high level of resistance of the isolates to doxycycline and ofloxacin. This is the first study involving isolation and susceptibility profile of these agents undertaken in the Amazonia.

Keywords: Mycoplasma, Ureaplasma, Mycoplasma Antimicrobial Resistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Árvore filogenética de alguns membros dos <i>Mollicutes</i>	18
Figura 2 – Vias metabólicas de produção de energia de <i>M. hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> sp.	21
Figura 3 – Estrutura química da roxitromicina	37
Figura 4 - Estrutura química da doxiciclina.....	37
Figura 5 – Estrutura química da ofloxacina	38
Figura 6 – Locais de realização do estudo	44
Figura 7 – Fluxo de processamento dos isolados após descongelamento.....	46
Figura 8 – Avaliação microscópica da morfologia colonial	46
Figura 9 – Caracterização fenotípica dos isolados.....	47
Figura 10 – Sistema <i>Mycofast Evolution Tray</i>	48
Figura 11 – Galerias de <i>Mycofast evolution tray</i> após 48 h de inoculação com isolados de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> sp.	51
Gráfico 1 – Resistência de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> sp. a doxiciclina, roxitromicina e ofloxacina	53
Gráfico 2 – Percentual de monorresistência a drogas de <i>Mycoplasma hominis</i> X <i>Ureaplasma</i> sp.	54
Gráfico 3- Resistência cruzada de isolados de <i>Mycoplasma hominis</i> x <i>Ureaplasma</i> sp. a doxiciclina, roxitromicina e ofloxacina.....	54

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Infecções urogenitais associadas as espécies <i>M. hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> sp.....	18
Quadro 2 – Tratamento das infecções urogenitais associadas a Micoplasmas - EUA.....	35
Quadro 3 –Terapêutica das síndromes uretrais por agentes menos frequentes (micoplasmas, ureplasmas, <i>T. vaginalis</i>), Brasil, 2006.....	35
Quadro 4 – Fluxo do <i>Mycofast evolution 2</i> - galeria <i>Mycofast Evolution Tray</i>	47
Quadro 5 – Cepas utilizadas para o controle de qualidade dos procedimentos analíticos.....	48
Quadro 6 – Testes complementares para caracterização fenotípica dos isolados.....	44
Tabela 1 – Caracterização fenotípica dos isolados de <i>Mycoplasma hominis</i> ..	50
Tabela 2- Caracterização fenotípica do sisolados de <i>Ureaplasma</i> sp.....	50
Tabela 3 – Resistência de diferentes isolados de <i>M. hominis</i> a doxiciclina (tetraciclina), roxitromicina (macrolídeos) e ofloxacina (fluorquinolonas), Manaus, Amazonas, Brasil..	51
Tabela 4 – Resistência de diferentes isolados de <i>Ureaplasma</i> sp. A doxiciclina (tetraciclina), roxitromicina (macrolídeos) e ofloxacina (fluorquinolona), Manaus, Amazonas, Brasil.....	52
Tabela 5 – Magnitude de resistência dos isolados de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> sp. a doxiciclina, roxitromicina e ofloxacina, Manaus, Amazonas, Brasil.	52
Tabela 6 – Resistência cruzada dos isolados de <i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> sp. a doxiciclina, roxitromicina e ofloxacin, Manaus, Amazonas, Brasil.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

A + T – Adenina + Timina

A7 – Agar 7 para Micoplasmas

BHI- Caldo *Brain Heart Infusion*

CDL – Centro de Diagnóstico Laboratorial

CCU – *Color Changing units*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.

G + C – Guanina + Citosina

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IPHM – Instituto de Patologia e Hematologia de Manaus

Kpb – Kilopares de Base

LAMPs – Lipoproteínas Associadas a Membrana

MBA – Múltiplas Bandas Antigênicas

µm – Micrômetro

MLA – Meio Líquido de Arginina

MIC – Concentração Inibitória Mínima

NF-kB – Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

nm – Nanômetro

PPLO – *Pleuropneumoniae Like Organisms*

PAP – Pneumonia Atípica Primária

PB – Pares de Bases

RNA – Ácido Ribonucleico

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TLR – *Toll Like Receptor*

UGA – Códon para Triptofano

UTC- Unidade Trocadora de Cor

U10 – Meio Urease para Ureaplasma

VAA – Variável Associada a Aderência

16sRNA – Segmento 16s do RNA

23sRNA –Segmento 23s do RNA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. ASPECTOS HISTÓRICOS E TAXONOMIA.....	16
2.2. CARACTERIZAÇÃO DOS GÊNEROS.....	18
2.3. PATOGÊNESE E FATORES DE VIRULÊNCIA.....	21
2.4 ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS	27
2.5. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	29
2.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	31
2.7.SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	32
2.8. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ANTIMICROBIANOS TESTADOS.....	36
2.9. DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA.....	39
3. OBJETIVOS.....	40
3.1. OBJETIVO GERAL	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. METODOLOGIA	41
4.1. OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS ISOLADOS.....	41
4.2. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS E TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS	41
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÕES	55
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	61
9. LIMITAÇÕES DA PESQUISA.....	62
10. REFERÊNCIAS.....	63
11. ANEXOS	70
12. APÊNDICES.....	70
12.1. ARTIGO ORIGINAL	71
12.2. ARTIGO DE REVISÃO.....	72
12.3 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	73

1. INTRODUÇÃO

“...Nenhum outro grupo de procariotas tem gerado tanta controvérsia, em relação ao estabelecimento de um nicho patogénico claro, como os micoplasmas...” (BASEMAN e TULLY, 1997)

Micoplasmas são microrganismos que evoluíram, regressivamente (pela redução do genoma) de ancestrais bacterianos gram-positivos com um pequeno conteúdo de DNA constituído predominantemente de guanina e citosina. Muitas de suas propriedades, como tamanho pequeno do genoma, pequeno número de genes operons de rRNA e tRNA, a falta de uma parede celular, o crescimento fastidioso e limitadas atividades metabólicas, são vistos como o resultado desta evolução e considerados fatores limitantes ao seu isolamento laboratorial. Talvez, devido ao imenso pleomorfismo, não haja outro grupo de microrganismos que tenha causado tanta controvérsia e confusão, para sua identificação, taxonomia e patogenicidade quanto os micoplasmas (BASEMAN e TULLY, 1997).

O papel dos *Mollicutes* nas doenças humanas tem intrigado vários pesquisadores. Algumas espécies são comprovadamente patogênicas para humanos: *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma parvum* e *Ureaplasma urealyticum*. As quatro últimas, consideradas patógenos urogenitais (PATEL e NYIRJESY, 2010).

As associações entre infecções por certas espécies de *Mollicutes* e complicações da gravidez, como febre puerperal e aborto (ODENDAAL, SCHOEMAN et al., 2002), levando à infertilidade (ABDULRAZZAK e BAKR, 2000; BACZYNSKA, FUNCH et al., 2007), o descobrimento de novas espécies, envolvidas inclusive com a infecção pelo Vírus da imunodeficiência Humana - HIV (BEBEAR, DE BARBEYRAC et al, 1993; MAVEDZENGE e WEISS, 2009) e mais recentemente a sua associação com o câncer de próstata (BARYKOVA, LOGUNOV, et al., 2011), somando-se a crescente resistência destes microrganismos aos antibióticos (CUMMINGS e McCORMACK, 1990; BÉBÉAR e KEMPF, 2005; KHAN, FARZAND et al., 2010; LELI, MENCACCI et al., 2012), têm demonstrado a carência de estudos a respeito de sua prevalência e envolvimento em doenças em certos grupos de pacientes, bem como sobre a eficácia das terapias antimicrobianas adotadas para a erradicação destes agentes.

As limitadas vias metabólicas tornam o seu isolamento a partir de amostras clínicas uma tarefa difícil, sendo necessária a introdução de meios enriquecidos contendo precursores para a biossíntese de ácidos nucléicos, proteínas e lipídios (BROWN, WHITCOMB e

BRADBURY, 2007). O teste de susceptibilidade é particularmente difícil considerando que condições de pH, a padronização do inóculo e problemas adicionais com a adição de fatores de crescimento também são fatores limitantes ao desenvolvimento de metodologias para a realização do antibiograma (KENNY e CARTWRIGHT, 2001).

Este estudo tem o objetivo de avaliar a susceptibilidade de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp a determinados antimicrobianos, convencionalmente utilizados para a terapêutica das infecções micoplásmicas urogenitais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos históricos e taxonomia

A primeira espécie de *Mycoplasma* foi isolada em 1882, por Nocard, Roux e colaboradores na França, durante um surto de pleuropneumonia bovina contagiosa (NOCARD E ROUX, 1882). Por serem “filtráveis”, estas bactérias foram considerados como vírus por muito tempo. Em 1937, DIENES e EDSALL registraram o isolamento do primeiro caso de PPLO (*Pleuropneumoniae Like Organisms*) em humanos a partir de amostra obtida de secreção das glândulas de Bartholin. Sucederam-se vários outros isolamentos de PPLOs em humanos, especialmente do trato genital, orofaringe e ocasionalmente de outros sítios anatômicos.

Em fins da década de 30 e início de 1940, foi detectada a existência de um processo pneumônico de etiologia não bacteriana, em uma síndrome denominada de pneumonia atípica primária (PAP). O agente foi evidenciado por EATON e MEIKLEJOHN (1944) e somente CHANOCK (1965), conseguiu cultivá-lo em meios artificiais; estava assim caracterizada a primeira espécie causadora de doença em humanos. O termo *Mollicutes* foi proposto por EDWARD e FREUND (1967), denominando assim a classe. Posteriormente, foram relatados, por outros pesquisadores, microrganismos semelhantes, isolados de humanos e animais. A partir daí muito se tem feito no campo da micoplasmologia humana, sobretudo nas últimas décadas (EDWARD e FREUND, 1967).

A espécie isolada em 1937 foi posteriormente classificada como *M. hominis*. Ureaplasmas foram primeiramente descritos em 1954 como forma *Tiny* de PPLOs isolados a partir de culturas de exsudatos uretrais de homens com uretrite pós gonocócica sendo chamados de T-Micoplasmas. Posteriormente baseando-se na capacidade única entre os PPLOs de hidrolisar a uréia a partir da enzima urease, foi proposta a sua separação em um novo gênero chamado *Ureaplasma* (SHEPARD e LUNCEFORD, 1965) e em 1967 *Ureaplasma urealyticum* (SHEPARD, LUNCEFORD et al, 1967). A partir daí foram descritas 14 sorovariedades (ROBERTSON e STEMKE, 1982) divididas em duas biovars (Parvo e T 960). Estudos de hibridização de DNA e padrões de clivagem com enzimas de restrição (RAZIN, TULLY et al, 1983), sequenciamento de segmento 16srRNA, genes urease e MBA e tamanho do genoma possibilitaram a obtenção de evidências fenotípicas e genotípicas que diferenciaram as biovars Parvo e T 960, ocasionando uma reclassificação da espécie *Ureaplasma urealyticum* em 02 espécies: *U. parvum* e *U. urealyticum* (KONEMAM e ALLEN, 2008), adotada atualmente na literatura.

Atualmente os micoplasmas são membros da classe *Mollicutes* (*Mollis* = mole, *cutis* = pele), pertencem ao filo *Firmicutes* e a divisão *Tenericutes*, uma das quatro divisões do reino *Prokaryotae*, a ordem *Mycoplasmatales* (EDWARD e FREUND, 1967) e a família *Mycoplasmataceae* (BROWN, WHITCOMB e BRADBURY, 2007). *Ureaplasma* sp. pertence ao grupo *M. pneumoniae* e *Mycoplasma hominis* pertence ao grupo *M. hominis* (Figura 01).

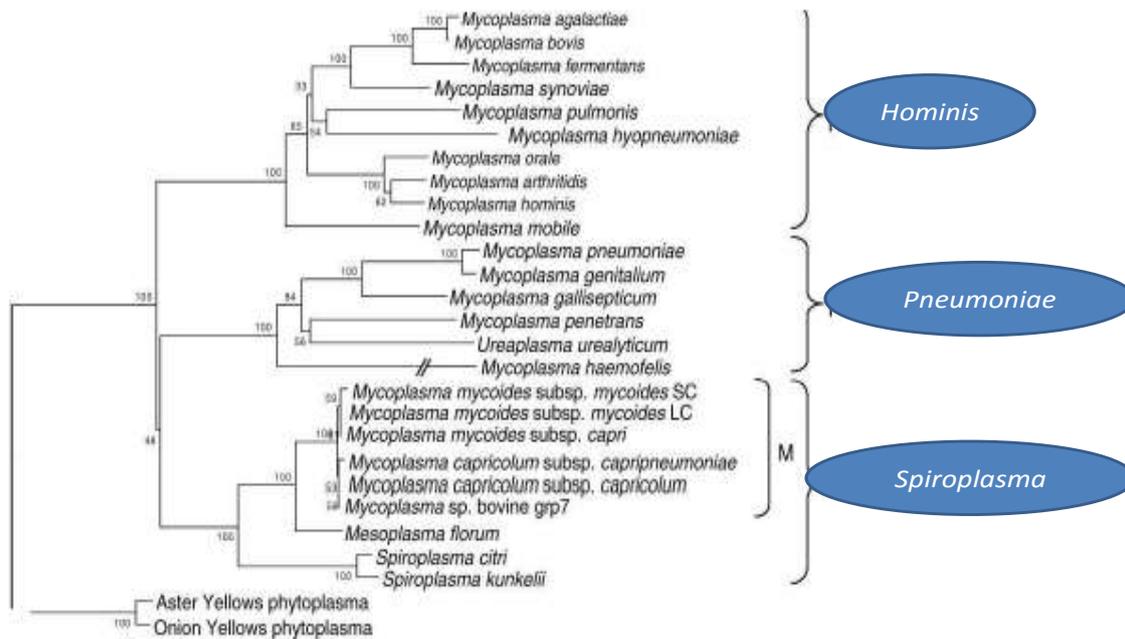


Figura 01. Árvore filogenética de alguns membros dos *Mollicutes* baseada no seqüenciamento do segmento 16SrRNA (Adaptado de SIRAND-PUGNET, LARTIGUE et al, 2007) mostrando os grupos H= grupo Hominis, P= grupo pneumoniae e S= Spiroplasma. *Ureaplasma urealyticum* na figura engloba as 14 sorovariedades e os gêneros *U. parvum* e *U. urealyticum*.

O gênero *Mycoplasma* apresenta aproximadamente 190 espécies, sendo 18 isoladas em humanos e o gênero *Ureaplasma* possui 07 espécies, sendo 02 isoladas em humanos. Estes dois gêneros são os que apresentam maior interesse em patologia humana (DANDO, NITSOS et al, 2012). Atualmente pelas características do gene 16S rRNA, novas classificações são frequentemente propostas, baseadas em marcadores genéticos alternativos, como o espaço intergênico 16S rRNA – 23S rRNA, gene *rpoB*, gene *gyrB* e gene *arcA*. Essas análises têm permitido corrigir classificações e distinguir melhor as espécies e subespécies. É possível até mesmo analisar a origem filogenética dos *Mollicutes* e averiguar possíveis explicações para o seu genoma reduzido (RAZIN e HAYFLICK, 2010).

2.2. Caracterização dos gêneros *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp.

Com dimensões semelhantes aos maiores vírus, medindo de 0,1 a 0,5 μm e total ausência de parede celular o que lhes confere uma morfologia típica e plasticidade, os *Mollicutes* dependendo do estágio fisiológico e de crescimento, pode apresentar forma circular, ovóide, cocobacilar ou filamentosa e algumas espécies possuem forma tipicamente helicoidal (Spiroplasmas) (RAZIN, 2006).

Os *micoplasmas* são os únicos procariotos a possuírem colesterol na constituição de sua membrana celular. Seu citoplasma está envolvido somente por uma membrana trilaminar de natureza lipoprotéica constituída de lipoproteínas e esteróis (ausentes nas bactérias com parede celular) e com aproximadamente 10 nm de espessura, sendo recoberta por uma camada extramembranosa poliônica de cerca de 15 a 30 nm de espessura (RAZIN, 1992). Além da membrana celular apresentam em seu interior DNA, RNA e ribossomos. Não possuem endosporos, fímbrias, flagelos ou grânulos. Cápsula polissacarídica foi detectada em algumas espécies, [ex. *M. mycoides*, subs. *Mycoides* (caprinos)]. Alguns possuem estruturas ou projeções polares (*M. pneumoniae*) e fibrilas responsáveis pela aderência, invasão e/ou motilidade por deslizamento em superfícies inertes. As espécies helicoidais apresentam fibrilas intracelulares que se contraem conferindo também motilidade. O tropismo por nutrientes foi demonstrado em algumas espécies helicoidais ou não (GIRON, LANGE e BASEMAN, 1996). O processo de replicação pode ocorrer simultaneamente por divisão binária e fragmentação filamentosa, dando origem a corpúsculos cocóides ou a formas filamentosas, respectivamente (ROTTEN, 2003; RAZIN e HAYFLICK, 2010).

Estes microrganismos são classificados como filogeneticamente relacionados às bactérias gram positivas, embora não seja possível uma classificação morfotintorial por não se corarem pelo gram; Sua morfologia pode ser analisada por microscopia eletrônica após fixação com metanol e coloração pelo Giemsa. Seu genoma circular de fita dupla é caracterizado pelo seu pequeno tamanho, variando de 580 a 2220 kpb e baixo conteúdo de guanina e citosina (23-40%). Possuem até dois operons para RNA ribossômico, poucos genes de reparo de DNA e várias sequências repetitivas. Algumas espécies patogênicas reorganizam seu DNA, por meio da replicação de sequências gênicas através de “transposon”, promovendo uma diversidade genética e maximizando o potencial de codificação de proteínas. Plasmídeos e bacteriófagos foram descritos em algumas espécies. A maioria usa UGA como códon para triptofano, ao

invés de ser um códon de término da síntese protéica, o que dificulta a clonagem de proteínas (WOESE, MANILOFF e ZABLEN, 1980; BLANCHARD e BROWING, 2005).

O genoma específico pode ser até 1/6 menor que o da *Escherichia coli*, o que determina uma modificação ou redução do número de vias metabólicas, embora algumas espécies apresentem alta capacidade adaptativa (RAZIN, 2006). Em contraste com as variantes fase L de bactérias, os micoplasmas são incapazes de sintetizar precursores de parede celular, em qualquer condição. Com o reduzido genoma, faltam em geral, vias enzimáticas envolvidas na síntese de parede celular, de purinas e de ácido fólico, ausência da via Entner-Doudoroff e do ácido tricarbóxico, esta pela ausência do transporte de elétrons por citocromos. No mecanismo de replicação do DNA, existe uma única DNA polimerase; algumas etapas da transcrição e a síntese protéica possuem outras enzimas (BLANCHARD e BROWING, 2005; RAZIN, 2006).

A falta de citocromos, faz com que os microrganismos descritos sejam dependentes quase que totalmente de substratos da fosforilação como fonte de energia. A membrana celular dos micoplasmas possui fosfolipídios, glicolipídios, colesterol e várias proteínas. A falta de uma estrutura rígida, como a camada de peptidoglicana, propicia alta elasticidade e morfologia irregular, sendo estas características responsáveis pelas dificuldades nas pesquisas sobre seu ciclo celular e sua caracterização morfológica (RAZIN, 2006).

Todas as espécies de micoplasmas produzem adenosina trifosfato (ATP) por fosforilação no nível do substrato efetuada pela ácido fosfoglucérico quinase e piruvato quinase, duas enzimas da via glicolítica, que se estende da glicose até o piruvato. Essas duas enzimas parecem constituir a principal fonte da maior parte do ATP sintetizado pelos *Mollicutes* (BLANCHARD e BROWING, 2005). As vias metabólicas envolvidas na geração de energia de *Ureaplasma* sp. são diferentes de *Mycoplasma hominis*.

2.2.1. *Mycoplasma hominis*

O Sequenciamento do genoma deste mollicute revelou que o seu tamanho é de 665,445 pb e 537 sequências codificadoras. O seu conteúdo de guanina/citosina é de 27,1%. É uma espécie não glicolítica. A via de Embden-Meyerhoff-Parnas está incompleta nessas bactérias, a geração de energia ocorre através da via dihidrolase arginina identificada por três proteínas sendo essencial para promover o crescimento *in vivo*. A presença prevista de dimetilarginina dimetilaminohidrolase sugere que o catabolismo da arginina é mais complexo do que o inicialmente descrito. Esta enzima pode ter sido adquirida por transferência horizontal de genes

de bactérias não pertencentes aos *Mollicutes*. Seu genoma contém duas cópias de rRNA. Nenhuma sequência de inserção, transposon, ou plasmídeo endógeno foi encontrado no seu genoma. Um conjunto de 43 lipoproteínas foram identificadas, incluindo três transportadores de substrato de ligação de proteínas ABC, duas nucleases e uma peptidase (PEREYRE, SIRAND-PUGNET et al., 2009).

2.2.2. *Ureaplasma* sp.

O gênero *Ureaplasma* sp. apresenta duas espécies associadas a doenças em humanos: *Ureaplasma urealyticum* com um genoma de 840 a 950 pb e *Ureaplasma parvum* com 750 a 780 pb (PARALANOV, LU et al., 2012). As espécies que compõem este gênero possuem a enzima urease o que as torna capazes de hidrolisar a uréia para produzir 95% da ATP necessária às suas reações metabólicas. A hidrólise da uréia leva a produção de amônia que resulta no aumento do potencial eletroquímico e nova síntese de ATP; a produção de ATP está associada a três componentes enzimáticos: urease, sistemas transportadores de amônia e F0F1-ATPase. Apresentam uma limitada capacidade de metabolizar carboidratos e não possuem genes para biossíntese de purinas e pirimidinas (GLASS, LEFKOWITZ et al, 2000).

As colônias em agar são bem menores que as de *Mycoplasma* sp. variando de tamanho entre 5 e 20 µm de diâmetro. São células extremamente pleomórficas com dimensões de 100 nm a 1,0 µm. Reproduzem-se por fissão binária com ausência da proteína FtsZ no processo de divisão celular. Apresentam um conteúdo de G+C de 25.5% e são os procariotos com genoma sequenciado que apresentam maior conteúdo de A+T. A caracterização molecular dividiu a espécie *Ureaplasma urealyticum* anteriormente com 14 sorovariedades em duas espécies: *Ureaplasma urealyticum* (10 sorovariedades) e *U. parvum* (sorovariedades 1,3,6 e 14). Seu genoma é constituído de um cromossomo circular com aproximadamente 613 genes codificadores de proteínas e 39 genes que codificam RNA (GLASS, LEFKOWITZ et al, 2000; PARALANOV, LU et al., 2012).

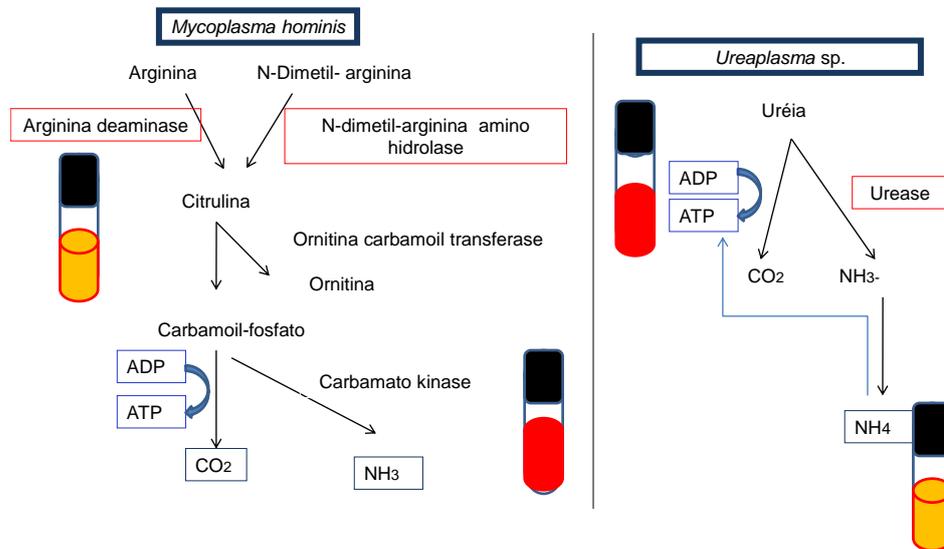


Figura 02. Vias metabólicas de produção de energia de *M. hominis* e *Ureaplasma* sp.

2.3. Patogênese e fatores de virulência

As espécies *Ureaplasma* sp. e *M. hominis* são extracelulares e residem normalmente na superfície epitelial das mucosas do aparelho urogenital, restringindo-se à superfície e raramente penetrando na submucosa. O fato destes microrganismos invadirem as células eucarióticas tem sido sugerido como um fator preponderante na cronicidade das infecções por conferir proteção a microrganismos contra anticorpos e antibióticos (ROTTEN, 2003). Esta persistência micoplásmica pode ser favorecida pela variação antigênica nas suas proteínas de superfície e também pela capacidade de provocar alterações do sistema imune (DANDO, NITSOS et al, 2012). Assim, vários mecanismos, grande parte desconhecidos, somados as condições ambientais, predisposição genética do hospedeiro e natureza da espécie envolvida, influenciam na patogenicidade dos micoplasmas. A ausência de parede celular permite um intercâmbio entre o agente e a célula hospedeira, com possibilidade de desencadear efeitos diversos nas células do hospedeiro como aberrações cromossômicas, inibição e estimulação mitótica e vários outros efeitos citopáticos, bem como, respostas imunológicas (DANDO, NITSOS, et al, 2012; RAZIN, 2006; BLANCHARD e BROWING, 2005).

Embora os potenciais fatores de virulência dos micoplasmas patogênicos para os seres humanos ainda não tenham sido estudados extensamente, foram descritos alguns possíveis

fatores, como adesinas, receptores celulares e liberação de substâncias específicas. A adesão micoplásmica à célula hospedeira é um pré-requisito para que ocorra a colonização e a infecção. Um grande número de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas utilizam as fímbrias para a fixação bacteriana (KONEMAN et al, 2008). Os micoplasmas não possuem estas estruturas.

Com o objetivo de melhor compreender os mecanismos de patogenicidade associados à capacidade de aderência dos micoplasmas às células do hospedeiro, podemos considerar três aspectos essenciais representados pela afinidade do microrganismo à célula alvo (aderência); a natureza dos componentes da membrana responsável pela aderência e a sua capacidade de produzir e induzir à liberação de substâncias específicas, tais como enzimas, toxinas ou inibidores metabólitos exercendo assim, seu efeito patogênico (LO, HAYES et al., 1991; STYLER e SHAPIRO, 1997; CUNHA, 2001; HOPFE, DAHLMANN e HENRICH, 2011).

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 adesão à célula hospedeira, sendo muitas vezes, responsável por uma motilidade deslizante, e o segundo, constituído de espécies desprovidas de tal estrutura. Aderem e colonizam as células epiteliais dos tratos respiratório e geniturinário. A aderência dos micoplasmas é firme o bastante para evitar a sua eliminação pelo epitélio ciliado ou pela urina. Além disso, a íntima associação dos micoplasmas com a superfície da célula hospedeira é extremamente vantajosa a medida que permite que o microrganismo desfrute de altas concentrações de nutrientes absorvidos pela membrana da célula hospedeira como aminoácidos, ácidos graxos e colesterol. Micoplasmas podem aderir a eritrócitos e células HeLa, espermatozoides, macrófagos, fibroblastos, células do epitélio traqueal e superfícies inertes como o vidro e o plástico. Os receptores envolvidos nas ligações com superfícies inertes seriam possivelmente diferentes daqueles envolvidos com a aderência celular (POLLOCK, WILLIAMS e McCELHANEY, 1997; RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998).

As adesinas têm sido muito bem caracterizadas em algumas espécies de micoplasmas. Foram demonstradas diversas proteínas de citoaderência em *M. hominis*, responsáveis pelo início da colonização e infecção. As lipoproteínas localizadas em sua superfície atuam na aderência a células eucarióticas (HOPFE, DAHLMANN e HENRICH, 2011). Até o momento foi identificada a proteína de citoaderência **P50** que liga-se a sulfatídios na membrana da célula hospedeira. Como no trato urogenital humano de ambos os sexos, são encontrados altas concentrações de glicolipídios sulfatados e outros glicoconjugados, a interação específica de *M. hominis* com essas moléculas pode ajudar a explicar o seu tropismo

pelo tecido urogenital. A lipoproteína de aderência **P100** de *M. hominis* também possui um domínio de ligação ao substrato para o transporte do peptídeo através da membrana celular (HENRICH, HOPFE et al, 1999).

As cepas de *M. hominis* também possuem uma outra proteína associada à aderência e exposta abundantemente na superfície de *M. hominis* denominada antígeno **Vaa** (variável associada a aderência), que é codificado por seis tipos de genes **Vaa** distintos. A expressão desses genes pode ser ativada ou reprimida e, foi postulado que essa capacidade de ativação e supressão promove a disseminação dos microrganismos de uma célula para outra.

A lipoproteína **P120**, a proteína **P120'**, que são específicas de *M. hominis* (MARDASSI, AYARI et al, 2007) e as proteínas **P60** e **P80** que formam um complexo de membrana na superfície (HOPFE e HENRICH, 2008) e **P75**, que está presente na a superfície de *M. hominis* também exercem papel na aderência (MYGIND, BIRKELUND e CHRISTIANSEN, 2000; PEREYRE, SIRAND-PUGNET et al., 2009), além de **OppA** que é uma proteína multifuncional envolvida na citoaderência e absorção de nutrientes e a principal ecto-ATPase na superfície de *M. hominis* e que induz a liberação de ATP a partir das células, resultando em apoptose, sugerindo assim uma função também na virulência de *M. hominis* (HOPFE e HENRICH, 2008). Alguns trabalhos evidenciam que resíduos siálicos e/ ou compostos sulfatados possam estar envolvidos nesse processo (SMITH, RUSSEL et al, 1994).

Ureaplasmas têm a capacidade de aderir a diferentes células eucarióticas mas as adesinas envolvidas neste processo ainda não foram identificadas. A participação de ácido N-acetilneuramínico (NANA) como um ligante molecular exercendo importante papel na citoaderência foi testada em experimento utilizando a enzima neuraminidase e os resultados deste estudo mostram que embora tenha diminuído, a citoaderência não foi totalmente inibida, o que aponta portanto que devem existir outros receptores moleculares envolvidos (SMITH, RUSSEL et al., 1994; PARALANOV, LU et al, 2012).

A produção e liberação de substâncias específicas: Enzimas, citocinas, e outros produtos finais do metabolismo das células micoplásmicas representam importantes mecanismos de patogenicidade. A íntima associação com as células hospedeiras tem como consequência o surgimento de um microambiente que possibilita um acúmulo de produtos tóxicos excretados pelo microrganismo, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxidos e amônia. A liberação de radicais superóxido (O_2) inibiria a catalase endógena, provocando a diminuição da superóxido dismutase e levando ao dano tecidual. Este processo, tornando-se contínuo, produziria danos oxidativos aos compartimentos vitais da célula hospedeira, em decorrência do consequente acúmulo de peróxido de hidrogênio (RAZIN,

2006). A patogenicidade dos micoplasmas também está relacionada a enzimas por eles sintetizadas. Aminopeptidases têm sido evidenciadas em *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Mycoplasma fermentans*. (CUNHA, 2001; BLANCHARD e BROWING, 2005).

Todos os micoplasmas associados à AIDS utilizam a glicose e hidrolizam a arginina. Diversos estudos mostram que a Arginina dihidrolase de *M. hominis* pode causar depleção do aminoácido L-arginina nos macrófagos e tecidos infectados. A arginina é um precursor de uma molécula diretamente envolvida na citotoxicidade mediada pelos macrófagos. Por conseguinte, a depleção de arginina em consequência da infecção por micoplasmas pode resultar em diminuição da citotoxicidade dos macrófagos. Este possivelmente seria um dos fatores a influenciar a progressão da infecção pelo HIV (LO, HAYES et al, 1991; RAZIN, 2006).

WATSON, BLALOCK et al, 1990 reportaram o encontro de um antígeno reconhecido por anticorpos séricos de humanos infectados, tal antígeno conteria epítomos que apresentavam reações cruzadas para sorovares específicas. A classificação original de isolados de ureaplasma em sorovares distintos foi em grande parte baseada em diferenças neste que se constitui o principal antígeno de superfície dos ureaplasmas. Este antígeno representa uma múltipla banda antigênica (MBA) constituída de um domínio terminal N conservado e um domínio terminal C variável. O domínio conservado contém um peptídeo de sinalização, local de ligação da lipoproteína e um domínio transmembranar. O MBA é reconhecido pelos receptores Toll-like 1, 2 e 6, e é capaz de induzir a produção de citocinas pela ativação do fator de transcrição gênica NF- κ B e de anticorpos (SHIMIZU, KIDA et al., 2008).

É concebível que a variação de MBA seja uma estratégia dos ureaplasmas a fim de evitar a resposta imune. A variabilidade antigênica impossibilita distinguir os antígenos específicos usados na sorotipagem das 14 sorovares e a MBA de cada sorovar parece não ter um número limitado de domínios variáveis podendo a sorovar adquirir ou perder genes que compõem o locus do MBA por transferência horizontal, havendo assim na verdade não uma única sorovar colonizando o hospedeiro mas sim uma população dinâmica que pode carregar genes com distintas funções relacionadas à patogenicidade. Os estudos do genoma de diferentes sorotipos ilustram que o potencial de patogenicidade poderá variar de acordo com o conjunto de genes que codificam as proteínas de superfície (PARALANOV, LU et al, 2012).

A presença de regiões hipervariáveis em seu DNA tem dificultado a identificação dos genes envolvidos na patogenicidade dos ureaplasmas, bem como na resistência a H₂O₂, um conhecido fator de patogenicidade destas espécies. A variação antigênica de MBA determinaria

o seu potencial em ativar o sistema imune, causar infecções crônicas no trato urinário alto e complicações na gravidez (DANDO, NITSOS et al., 2012; PARALANOV, LU et al., 2012).

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. A amônia é outro produto final do metabolismo de algumas espécies de micoplasmas que pode representar um importante fator de patogenicidade quando produzida em grandes quantidades (SMITH, RUSSEL et al., 1994).

Não há evidências que ureaplasmas produzam toxinas, eles possuem diversos fatores de virulência associados a proteases específicas para IgA. Assim a ação de IgA secretora a nível de mucosa poderia ser bloqueada por proteases produzidas por *U. urealyticum* e *U. parvum*, o que se constitui em um importante fator de virulência que favoreceria sua evasão ao sistema imune (KILIAN e FREUNDT, 1984; PARALANOV, LU et al., 2012).

Estudos experimentais mostram que *Mollicutes*, como as espécies do gênero *Ureaplasma* sp. possuem fosfolipases na membrana, cuja ação direta nos fosfolipídios do hospedeiro pode acarretar a produção de ácido araquidônico, diacilglicerol e lisofosfolipídio, que são substâncias capazes de promover a liberação de citocinas a partir de macrófagos, aumentando também a atividade de prostaglandinas. Os isolados de *U. urealyticum* produzem três fosfolipases (PLA₁, PLA₂ e PLC) que se localizam na membrana plasmática. Essas enzimas hidrolizam fosfolipídios, liberando ácido araquidônico. Foi postulado que a infecção do trato urogenital pode desencadear uma sequência de eventos patológicos relacionados com a produção de fosfolipases. A liberação de ácido araquidônico das membranas amnióticas pode levar a produção de prostaglandinas. Considerando-se que um dos efeitos do aumento de prostaglandinas é a estimulação uterina, a participação destes microrganismos em insucessos da gestação, bem como, no desencadeamento de trabalho de parto prematuro tem sido considerada (DE SILVA e QUINN, 1999). Estudo realizado por PARALANOV, LU et al (2012) não detectou genes para fosfolipases em nenhum dos isolados de *M. urealyticum* e *Ureaplasma parvum* que tiveram seus genomas seqüenciados.

O *Ureaplasma urealyticum* induz a produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 em linhagens celulares de macrófagos tanto de humanos quanto de ratos e estimula a liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares cultivados. Foi também demonstrado que *U. urealyticum* tem a capacidade de induzir apoptose em células epiteliais e macrófagos do pulmão humano (RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998). Os micoplasmas também liberam nucleases no meio de crescimento que degradam os ácidos nucléicos das células hospedeiras,

gerando precursores para a síntese de seus próprios ácidos nucléicos. PARALANOV, LU et al., 2012, identificaram 15 potenciais nucleases cujo envolvimento na patogenicidade dos micoplasmas precisa ser melhor estudada.

A presença de genes semelhantes aos que codificam as enzimas glutathione peroxidase e peroxiredoxina no genoma de ureaplasmas poderiam exercer um papel no estresse oxidativo e na produção de bacteriocinas nas células da superfície mucosa por eles colonizadas, assim como a descrição de um sistema tioredoxina redutase sugerindo-se que o mesmo atue na detoxificação de espécies reativas de oxigênio no interior dos micoplasmas (MENACHEM, HIMMELREICH et al., 1997). Diversos outros fatores podem estar envolvidos nos processos de patogênese dos micoplasmas, embora não tenham seus modos de ação elucidados.

2.4. Aspectos clínicos-epidemiológicos

Apenas 07 espécies de micoplasmas têm sido isoladas em tecidos urogenitais e apenas 05 espécies: *Mycoplasma penetrans*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *Ureaplasma parvum* (anteriormente chamado de *Ureaplasma urealyticum* sorovar 3) e *Ureaplasma urealyticum* tem sido associados a processos patogênicos (TAYLOR-ROBINSON E JENSEN, 2011). Algumas espécies como *M. penetrans*, *M. fermentans*, *M. pirum* e *M. genitalium* ocorrem intracelularmente, o que os protege da ação do sistema imune e do efeito dos antibióticos (RAZIN, YOGEV E NAOT, 1998).

O estudo da epidemiologia da aquisição do microrganismo sugere ainda que as taxas de colonização do trato genital de homens e mulheres estão relacionadas com a atividade sexual e indivíduos com maior número de parceiros sexuais têm mais tendência a serem colonizados. Assim, uma importante via de transmissão de *Ureaplasma urealyticum* e *M. hominis* é através de contato sexual e, portanto, o comportamento sexual ativo em populações pode contribuir para os riscos crescentes de infecção. Diversos estudos tem mostrado que as infecções são mais freqüentes no grupo de pacientes que freqüentaram clínica de DST's, e correlacionadas com a idade e atividade sexual (EMBREE, 1988; JALIL, DOBLE et al., 1988; CUNHA, 2001; ZDRODOWSKA-STEFANOW, KOSOWSKA et al., 2006; SHORT, TOTTEN et al., 2009, SHORT, TOTTEN et al., 2010; TAYLOR-ROBINSON E JENSEN, 2011).

Mycoplasma hominis faz parte da microbiota comensal da vagina de 20 a 50% de mulheres assintomáticas, podendo atingir 90% das mulheres que frequentam as clínicas genitourinárias (TAYLOR, 1998; WAITES, K., C. BÉBÉAR, et al., 2011). Nos homens, a colonização varia entre os 5% (saudáveis) e os 40%. A colonização por este agente, tal como

por *Ureaplasma sp.*, está relacionada além de idade jovem e atividade sexual com múltiplos parceiros, a baixo nível sócio-econômico, e uso de anticoncepcionais orais, sendo mais frequente em pessoas da raça negra. *Ureaplasma sp.* pode ser encontrado na vagina de 40 a 80% das mulheres sexualmente ativas assintomáticas, sendo esta percentagem mais baixa nos homens (WAITES, K., C. BÉBÉAR, et al., 2011).

Estudo realizado na Índia englobando o período de 2005 a 2009 mostram taxas variando entre 42,03% e 45,23% para *Ureaplasma urealyticum* em mulheres e 2,06% para *M. hominis*. As taxas de coinfeção variaram entre 4,78% e 16,15%. Neste estudo a taxa de infecção significativamente maior foi encontrada nas mulheres jovens (faixa etária: 16-35 anos) 69, 61% seguida de 60,23% de prevalência nas mulheres na faixa etária de 36 a 50 anos, evidenciando ainda a alta frequência em indivíduos com vida sexual ativa. O padrão de infecção mais comum, assim como em outros países foi de mono-infecção por *Ureaplasma urealyticum* (46,52%). Seguido de co-infecção (13,91%) e a mono-infecção por *M. hominis* foi menor (1,71%) (ZHU, LIU et al., 2012).

O isolamento de micoplasmas tem sido registrado em amostras clínicas oriundas de ambos os sexos envolvidos numa variedade de condições clínicas primariamente relacionadas à colonização e infecção do trato genital inferior, infecções do trato genital superior em mulheres e ainda infecções do trato genital inferior e prostatite em homens. É evidente que tais microrganismos são excessivamente prevalentes, sobretudo no trato genital inferior de mulheres sexualmente ativas e portanto, associados à DST's (Doenças Sexualmente Transmissíveis) podendo desencadear diversos quadros patogênicos. As desordens urogenitais associadas às espécies *Mycoplasma hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* são apresentados no quadro 01. No Brasil, dados sobre prevalência e susceptibilidade são praticamente desconhecidos para a grande maioria dos clínicos.

Quadro 01: Infecções urogenitais associadas as espécies *M. hominis* e *Ureaplasma* sp.

Patologias Associadas	<i>Ureaplasma</i> sp.	<i>M.hominis</i>	Referências
Uretrite não gonocócicas	++	+	COULDWELL, et al, 2010. SHORT, TOTTEN, et al, 2009 DEGUCHI, YOSHIDA, et al, 2004 HORNER, THOMAS et al, 2002 KILIC, BASAR et al, 2004
Uretrites gonocócicas pós	++	++	SHORT, TOTTEN, et al, 2009
Uretrites gonocócicas e clamidiais não e não	+	+	COULDWELL, et al, 2010 PATEL e NYIRJESY, 2010 SCHLICHT, LOVRICH, et al, 2004
Vaginose bacteriana	++	+	PATEL e NYIRJESY, 2010 KEANE, THOMAS, et al, 2000 POLVSEN, THORSEN, et al, 2001
Vaginite		+	PATEL e NYIRJESY, 2010 NEKTARIA, BERSIMIS, et al, 2008 BALÁZS, ESZTER, et al, 2011 DANDO, NITSOS, et al, 2012
Cervicite	++	+	DANDO, NITSOS, et al, 2012 PATEL e NYIRJESY, 2010 BALÁZS, ESZTER, et al, 2011 SCHLICHT, LOVRICH, et al, 2004.
Endometrite	+		DANDO, NITSOS, et al, 2012
Febre pós-parto	+	+++	BJARTLING, OSSER et al, 2010 DANDO, NITSOS, et al, 2012 EMBREE, 1998.
Baixo peso ao nascimento	+		DANDO, NITSOS, et al., 2012 EMBREE, 1998 CASSEL, WAITES, et al., 1993. FONSECA, 2011

Patologias associadas	<i>Ureaplasma sp.</i>	<i>M. hominis</i>	Referências
Febre puerperal		++	DANDO, NITSOS, et al., 2012 EMBREE, 1998
Carcinoma de próstata		+	BARYKOVA, LOGUNOV, et al., 2011.
Cistite	+	++	HEDELIN, MARDH et al., 1983.
DIP	++		DANDO, NITSOS, et al., 2012
Epididimite	+		ITO, TSUCHIYA, et al., 2012. JALIL, DOBLE, et al., 1988.
Prostatite	+		MANDAR, RAUKAS, et al., 2005
Infertilidade	+	+	ABDULRAZZAK e BAKR, 2000 STILER e SHAPIRO, 1997. MIHAI, BOGDAN, et al., 2011.
Abortos e prematuridade	+	+	DE SILVA e QUINN, 1999. ODENDAAL, SCHOEMAN, et al., 2002. CASSEL, WAITES et al., 1993.
Salpingite aguda		++	DANDO, NITSOS, et al., 2012
Morte perinatal	++		DANDO, NITSOS, et al. 2012 EMBREE, 1998 CASSEL, WAITES et al., 1993 WAITES, KATZ et al., 2005.

+ possivelmente associado, ++ fortemente associado

2.5. Aspectos imunológicos

A complexa interação entre micoplasma e o sistema imune do hospedeiro envolve a indução de reações imunes específicas e inespecíficas. Mecanismos de defesa específicos incluem a produção de anticorpos via sistêmica e local, de diferentes classes e subclasses; estímulo da imunidade mediada por células, opsonização e fagocitose dos microrganismos. As reações imunológicas específicas suscitadas pela invasão dos micoplasmas, essencial para

resistência e proteção frente a infecção por esses patógenos, tem também mostrado exercer um papel no desenvolvimento de lesões e exacerbação de doenças causadas por micoplasmas (BLANCHARD e BROWING, 2005).

Adicionalmente as respostas imunes antimicoplásmicas, esses microrganismos exercem efeitos imunomoduladores inespecíficos sobre as células do sistema imune induzindo uma supressão ou estimulação policlonal de linfócitos B e T, indução de citocinas, aumento da citotoxicidade de macrófagos, células natural killer e células T, promovendo a expressão de receptores celulares e a ativação da cascata do complemento. Essa habilidade de exercer efeitos imunomoduladores no hospedeiro contribui para suas propriedades de patogenicidade, uma vez que pode evadir-se ou suprimir mecanismos de defesa e estabelecer uma infecção crônica e persistente, conforme já relatado anteriormente (RAZIN e HAYFLICK, 2010; DANDO, NITSOS et al., 2012).

Dentre os efeitos imunomoduladores atribuídos aos micoplasmas, estudos *in vitro*, demonstraram que alguns dos micoplasmas são capazes de:

a) Aumentar o efeito citopático do HIV (LO, HAYES et al., 1991; MACKENZIE, NISCHIK et al., 2010);

b) Funcionar como imunomoduladores, induzindo a ativação policlonal dos linfócitos T e B (MUHLRADT, 1996; BLANCHARD e BROWING, 2005; RAZIN e HAYFLICK, 2010);

c) As lipoproteínas de membrana (LAMPs) seriam ligantes para os receptores da imunidade inata TLR 2, 4 e 6, com a co-participação de CD 14, levando a ativação da via de sinalização myd 88 e ativação de NF-KB resultando na secreção de citocinas pró-inflamatórias por vários tipos de células (MCGOWIN, MA et al., 2009);

d) Produção de superantígenos que atuam como potentes mitógenos, estimulando a liberação de várias linfocinas e citocinas imunomoduladoras (MUHLRADT, 1996; RAZIN, YOGEV e NAOT, 1998);

e) Geração de radicais livres que contribuíram para o estresse oxidativo observado na infecção pelo HIV (BLANCHARD e BROWING, 2005);

f) Apoptose (RAZIN, 2006);

g) Produzir exotoxinas, fosfolipases, proteases e hemolisinas membranares (PARALANOV, LU et al, 2012, DANDO, NITSOS et al., 2012);

h) Ureaplasmas produziram proteases para imunoglobulina A que podem facilitar a invasão da mucosa através da hidrólise de IgA (KILIAN, FREUNDT et al, 1984;

BLANCHARD e BROWING, 2005; PARALANOV, LU et al, 2012; DANDO, NITSOS et al., 2012);

i) depleção de L-arginina e conseqüentemente diminuição da citotoxicidade de macrófagos (RAZIN, 2006).

J) Indução de MHC I e II, CD 40, CD 80 e CD 86; Indução da secreção de IL 23 por células dendríticas (Truchetet et al, 2011).

2.6. Diagnóstico laboratorial

A infecção micoplásmica deve ser sempre considerada quando há sintomas que podem desempenhar algum papel na doença e onde o isolamento e a identificação de outros microrganismos resultarem negativos. Estes microrganismos tão diminutos são exigentes quanto ao seu cultivo. Espécies como *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma fermentans* e *Mycoplasma genitalium* possuem um crescimento fastidioso com uso de apenas algumas vias bioquímicas, tornando o seu isolamento a partir de amostras clínicas uma tarefa difícil, sendo necessária 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. Por outro lado, as espécies do gênero *Ureaplasma* sp. e a espécie *Mycoplasma hominis* são facilmente identificadas nos meios de cultura (RAZIN, 2006).

Em virtude de seu pequeno conteúdo genético, o cultivo de *Mollicutes* é difícil, exigindo meios enriquecidos. Os precursores de ácidos nucléicos e proteínas são proporcionados principalmente pelo meio de peptona basal enriquecido e extrato de levedura, enquanto os lipídios são fornecidos pela inclusão de soro (BROWN, WHITCOMBB e BRADBURY, 2007).

Os micoplasmas de origem humana são divididos em três grupos, com base na utilização de três substratos: glicose, arginina e uréia. Dependendo da espécie investigada, o meio basal é enriquecido com peptona contendo extrato de leveduras e soro e um dos substratos acima citados e a adição de um indicador de pH (habitualmente vermelho de fenol). *M. hominis* metaboliza a arginina com a produção de amônia e mudança do pH do neutro para o alcalino. Ureaplasmas possuem a enzima urease que hidrolisa a uréia em amônia, resultando também em pH alcalino (BLANCHARD e BROWING, 2005).

As amostras para pesquisa de micoplasmas urogenitais são rotineiramente semeadas em meio sólido e em caldo enriquecido seletivo e diferencial. Os antibióticos comumente adicionados são ampicilina, penicilina, polimixina B e anfotericina B para inibir bactérias e fungos contaminantes e sem espectro de ação em micoplasmas (BROWN, WHITCOMB e BRADBURY, 2007).

Os micoplasmas de origem humana diferem quanto ao pH ótimo para crescimento e quanto as condições atmosféricas necessárias para o isolamento bem sucedido de amostras clínicas. Os meios de isolamento para *M. hominis* são tamponados num pH inicial de cerca de 7,0 e o meio para *Ureaplasma* sp. num pH inicial levemente ácido em torno de 6,0. A temperatura de crescimento considerada ótima varia de 35 a 37⁰ Celsius e uma atmosfera de 5 a 10% de CO₂ (BLANCHARD e BROWING, 2005; BROWN, WHITCOMB e BRADBURY, 2007).

2.7. Susceptibilidade de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. a antimicrobianos

A falta de uma metodologia padronizada, dificulta a comparação de resultados entre os diversos estudos encontrados na literatura sobre o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. Fatores como tamanho do inóculo, pH dos meios e tempo de incubação são conhecidos por alterar drasticamente a concentração inibitória mínima (MIC) e tem dificultado a padronização de metodologias de detecção de resistência. Além disso a determinação da susceptibilidade a antibióticos de micoplasmas normalmente requer a predeterminação do título bacteriano, ou seja, um método que permita a quantificação simultânea de bactérias e a determinação da sensibilidade à antibióticos, e o método mais utilizado é o de inibição metabólica (HANNAN, 2000; BROWN, WHITCOMB e BRADBURY, 2007). Com o objetivo de padronizar os procedimentos aplicados ao estudo da susceptibilidade de micoplasmas humanos aos antimicrobianos o CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) publicou o guia M43A, documento que representa um avanço ao estudo da susceptibilidade destes organismos (CLSI M43A 2011).

Ao considerar o 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, como as cefalosporinas e carbapenêmicos; também não são susceptíveis a agentes que interferem com a síntese de ácido fólico como sulfas e trimetoprim (CUMMINGS e MCCORMACK, 1990).

Embora sejam susceptíveis a alguns agentes que afetam DNA, RNA, síntese protéica e a integridade da membrana, como em seu mecanismo de replicação do DNA existe uma única DNA polimerase, algumas etapas da transcrição e da síntese protéica envolvem outras enzimas. Como parte das consequências destas diferenças, existe a resistência intrínseca a polimixinas, fosfomicina, sulfonamidas, trimetoprim, nitrofurantoina, vancomicina e rifampicina. São sensíveis a uma variedade de antibióticos de largo espectro como as tetraciclina (doxiciclina) e as quinolonas, utilizadas na maior parte das infecções micoplásmicas humanas enquanto que a resistência a macrolídeos e lincosaminas é variável, de acordo com a espécie (KENNY e CARTWRIGHT, 2001).

Dentre os grupos de antimicrobianos Macrolídeos, Lincosaminas e Estreptograminas, *M. hominis* é naturalmente resistente à eritromicina, apresenta resistência variável a azitromicina, claritromicina, roxitromicina e outros representantes do grupo dos macrolídeos, por vezes apresentando alguma sensibilidade *in vitro* mas ineficazes *in vivo* (BALÁZS, ESZTER et al. 2011). Dentre as lincomicina, a josamicina apresenta excelente sensibilidade *in vitro* e *in vivo* (KRAUSSE e SCHUBERT, 2010). Em um estudo realizado na Turquia, foi encontrado 100% de resistência em todos os isolados de *M. hominis* obtidos de amostras urogenitais a eritromicina, confirmando que essa espécie é intrinsecamente resistente a este antimicrobiano do grupo dos macrolídeos, mas níveis de sensibilidade diferentes destes foram registrados para outros membros do grupo: 40% e 0 % para azitromicina e josamicina respectivamente. No mesmo estudo foi detectado 22,2%, 22,2% e 0% de resistência de *Ureaplasma* sp. para eritromicina, azitromicina e pristinamicina respectivamente, o que demonstra a efetividade dos macrolídeos para isolados de Ureaplasmas (BAYRAKTAR, OZEROL et al., 2010) e corrobora a informação de que os macrolídeos mostram uma maior atividade sobre *Ureaplasma* sp. e são totalmente ineficazes contra *Mycoplasma hominis* (HUANG, LIU et al., 2003; NEKTARIA, BERSIMIS et al., 2008).

Em estudo realizado na China no período de 1999 a 2004, são relatados dados semelhantes para isolados urogenitais de *Ureaplasma urealyticum* em relação a josamicina e pristinamicina. Azitromicina, claritromicina e eritromicina apresentaram 17,1%, 17,1% e 19,5% de resistência respectivamente (XIE e ZHANG, 2006). Dados semelhantes têm sido encontrados em outras regiões do mundo (KHAN, FARZAND et al., 2010; HUANG, LIU et al., 2003; MARTINEZ, CASTILLO et al., 2006; NEKTARIA, BERSIMIS et al., 2008).

Dados obtidos em estudo realizado na Índia no período de 2005 a 2009 demonstram um percentual de resistência a Josamicina, Claritromicina, Roxitromicina e Azitromicina para

Ureaplasma urealyticum de 11,96%, 6,05%, 33,03% e 15,21% respectivamente e para *M. hominis* de 5,26%, 85,96%, 89,46% e 85,96% respectivamente, confirmando a boa efetividade da Josamicina para ambas as espécies e a resistência intrínseca aos outros macrolídeos apresentada por *M. hominis*.

Lincomicina, clindamicina e a rifampicina também podem ser usados como uma alternativa terapêutica caso dados de susceptibilidade regionais, considerando a espécie isolada estejam disponíveis, pois existem diferentes níveis de sensibilidade para estas drogas nas diversas regiões do mundo (HUANG, LIU et al., 2003; GHALEH, BEHBAHAN et al., 2008). Os Aminoglicosídeos podem apresentar atividade *in vitro*, mas não são eficazes *in vivo* (OPLUSTIL, ZOCCOLI et al., 2004).

As tetraciclinas têm apresentado boa efetividade tanto para *M. hominis* quanto para *Ureaplasma* sp, a doxiciclina mostra-se mais ativa em algumas regiões do mundo. Na China foi encontrado 4,4% de resistência a doxiciclina comparado a 9,8% a tetraciclina em isolados de *Ureaplasma urealyticum* (XIE e ZHANG, 2006), enquanto que estudo realizado na Turquia apontou que as duas drogas são altamente efetivas (BAYRAKTAR, OZEROL et al., 2010). Na Índia ZHU, LIU e colaboradores encontraram 1,56% de resistência de *Ureaplasma urealyticum* para Doxiciclina enquanto que para *M. hominis* esta droga se mostrou 100% efetiva *in vitro*. Esses dados contrastam com dados encontrados por KHAN, FARZAND et al., (2010) no Paquistão que evidenciam uma elevada resistência de isolados de *M. hominis* e *Ureaplasma* sp. as tetraciclinas e demonstram a variação nos perfis de sensibilidade ao redor do mundo.

As fluoroquinolonas são os únicos antimicrobianos com efeito bactericida para os micoplasmas, outros agentes antimicrobianos agem primariamente como bacteriostáticos. 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. 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 (DUFFY, GLASS, et al., 2006). Estudos epidemiológicos mostram que a resistência de *M. hominis* e *Ureaplasma* sp. as fluoroquinolonas tem se elevado no mundo inteiro. Na Índia encontrou-se 32,96%, 20,09% e 27,37% de resistência a ofloxacina, levofloxacina e sparfloxacina para *Ureaplasma urealyticum* e 47,37%, 35,09% e 42,11% para *M. hominis* respectivamente.

A terapia antimicrobiana empírica preconizada para infecções por micoplasmas nos Estados Unidos da América (EUA) inclui apenas a espécie *M. genitalium* inserida entre os microrganismos associados a processos patogênicos genitais, de acordo com o guia de doenças sexualmente transmissíveis publicado pelo CDC em 2010 (Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010). Este esquema terapêutico é demonstrado no quadro 02. No Brasil o guia de tratamento de DST's editado pelo Ministério da Saúde (Manual de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis DST, 2006) menciona de forma muito superficial a abordagem terapêutica a estes agentes, referindo-se a falhas de tratamento e ou recidiva de corrimento após tratamento adequado do paciente e seus parceiros nas infecções por gonorréia e/ ou clamídia. Conforme este manual deverá ser oferecido tratamento para agentes menos frequentes (micoplasma, ureaplasma, *T. vaginalis*), apresentado no quadro 03. Na mesma citação o guia atenta para possibilidade de resistência medicamentosa ou diminuição da sensibilidade no Brasil e em outros países.

Quadro 02: Tratamento das Infecções urogenitais associadas a Micoplasmas - Estados Unidos (EUA) 2010.

REGIME RECOMENDADO			
ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO	POSOLOGIA/VIA ADMINISTRAÇÃO	DE
azitromicina	01 g	dose única oral	
doxiciclina	100 mg	02 vezes ao dia por 07 dias via oral	

REGIME ALTERNATIVO			
ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO	POSOLOGIA/VIA ADMINISTRAÇÃO	DE
eritromicina	500 m g	04 vezes ao dia por 07 dias via oral	
eritromicina etilsuccinato	800 mg	04 vezes ao dia por 07 dias via oral	
levofloxacina	500 mg	via oral 07 dias	
ofloxacina	300 mg	02 vezes ao dia por 07 dias via oral	

Quadro 03. Terapêutica das síndromes uretrais por agentes menos frequentes (micoplasmas, ureplasmas, *T. vaginalis*), Brasil, 2006.

REGIME RECOMENDADO			
ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO	POSOLOGIA/VIA ADMINISTRAÇÃO	DE
estearato de eritromicina	500 mg	via oral 6/6h por 07 dias	
metronidazol	02 g	via oral dose única	

2.8. Características gerais dos antimicrobianos testados

2.8.1. Roxitromicina

A roxitromicina é um macrolídeo, cuja estrutura pode ser observada na figura 03. É um derivado da eritromicina, onde o anel semi-sintético da lactona foi modificado evitando a sua inativação pelo suco gástrico. A atividade *in vitro* da roxitromicina é semelhante a de outros macrolídeos. Roxitromicina é ativa contra cocos Gram-positivos e Gram-negativos, bacilos Gram positivos e alguns bacilos Gram-negativos. Também exibe boa atividade contra patógenos atípicos, como *Mycobacterium avium*, *Helicobacter pylori* e *Borrelia* sp. Penetra e se acumula no interior das células, tais como macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), onde se distribui entre os grânulos e o citosol celular, mostrando-se ativa contra patógenos intracelulares, tais como a *Legionella* sp., *Chlamydia* sp., *Mycobacterium* sp., *Rickettsia* sp. e *Borrelia* sp. (BRYSKIER, 1998).

Tal como outros macrolídeos, roxitromicina exibe um significativo efeito pós-antibiótico que é dependente do patógeno em estudo, da concentração de roxitromicina e da duração da exposição. *In vivo*, a roxitromicina é tão eficaz ou mais eficaz do que outros macrolídeos em uma grande variedade de infecções. No trato genital tem uma boa efetividade contra *Gardnerella vaginalis* e *C. trachomatis* mas não é ativa contra *M. hominis* e é extremamente ativa contra *Ureaplasma* sp. e sua atividade contra *Neisseria gonorrhoeae* tem sido investigada (BRYSKIER, 1998).

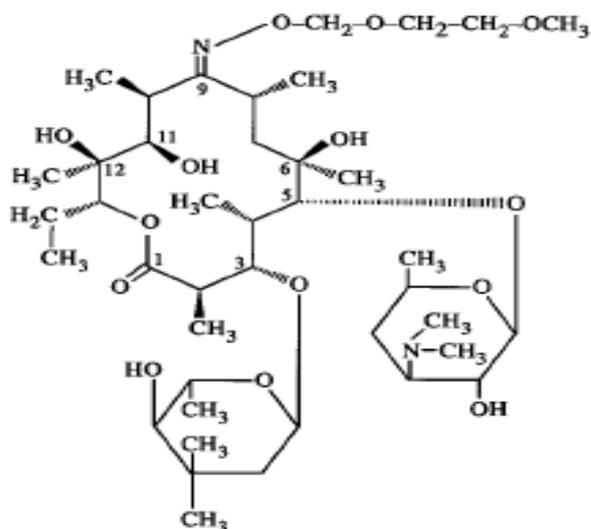


Figura 03. Estrutura química da roxitromicina.

2.8.2. Doxiciclina

A Doxiciclina ou 6-deoxi-5-hidroxitetraciclina (figura 04), é um antimicrobiano que foi descoberto em 1967 e compõe a segunda geração de tetraciclina, cujo mecanismo de ação ocorre através da inibição da síntese proteica por prevenir a fixação de aminoacil-tRNA ao sítio receptor ribossomal. As tetraciclina são agentes de largo espectro exibindo atividade contra uma ampla gama de bactéria Gram negativas e Gram positivas, organismos atípicos como clamídias, micoplasmas e rickettsias (CHOPRA, 2001).

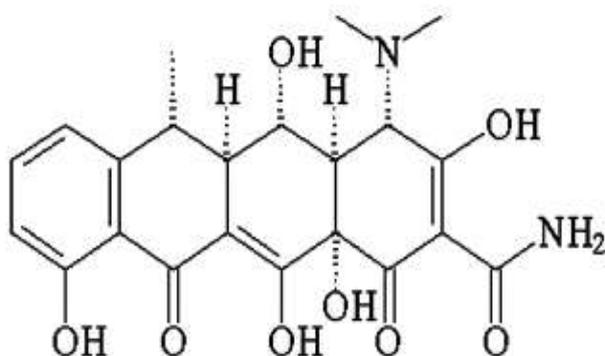


Figura 04. Estrutura química da doxiciclina

2.8.3. Ofloxacina

Este antimicrobiano pertence a geração de quinolonas fluoradas estruturalmente relacionadas com o ácido nalidíxico. Sua atividade antimicrobiana se relaciona com a inibição das topoisomerasas bacterianas do tipo II, também conhecida como DNA girases. As topoisomerasas são enzimas que catalisam a direção e a extensão do espiralamento das cadeias de DNA. Atuam também na enzima topoisomerase IV. Estas enzimas introduzem no DNA dobras super helicoidais de dupla corrente. A DNA girase tem duas subunidades codificadas pelo gene *gyrA*, e por sua ação, libertam-se as alças do DNA bacteriano para a replicação do material genético. As quinolonas inibem estas subunidades impedindo a replicação e a transcrição do DNA. É um fármaco administrado por via oral de espectro antibacteriano amplo e provou ser eficaz contra uma percentagem elevada de infecções causadas por organismos Gram-negativos, ligeiramente menos eficaz contra infecções por bactérias Gram-positivas, e eficaz contra algumas infecções anaeróbias (OLIPHANT e GREEN , 2002).

Como a ciprofloxacina, outra fluorquinolona amplamente prescrita, apresenta boa atividade antibacteriana *in vitro*. No entanto, o perfil farmacocinético de ofloxacina é superior ao da ciprofloxacina, com uma absorção mais rápida e uma concentração sérica máxima várias vezes superior. Além disso, a ofloxacina atinge concentrações elevadas na maior parte dos tecidos e fluidos corporais. Até 10 anos atrás apresentava boa eficácia clínica em uma variedade de infecções sistêmicas, bem como em infecções agudas e crônicas do trato urinário, e em geral parece ser eficaz como alternativa oral. Ofloxacina é bem tolerada e, porém seu uso irrestrito junto com outras fluorquinolonas levou ao aparecimento de resistência, embora a resistência bacteriana para ofloxacina parece não se desenvolver tão rapidamente quanto para ciprofloxacina (OLIPHANT e GREEN , 2002).

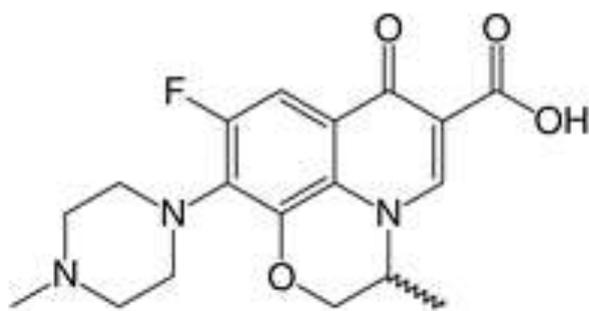


Figura 05. Estrutura química de ofloxacina.

2.9. Determinantes genéticos de resistência

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 à mobilidade plasmidial ou *transposons* (BEBEAR e KEMPF, 2005; BEETON, CHALKER et al., 2009; BOUTHEINA, AISSANI et al., 2012).

2.9.1 Caracterização molecular de isolados resistentes as tetraciclinas

A resistência à tetraciclina pode ser primariamente devido ao efluxo de energia e alterações de ribossomos dependentes da tetraciclina ligada a proteínas ou a proteção dos ribossomos à ação deste antibiótico. As proteínas de efluxo da tetraciclina tem aminoácidos e proteínas estruturais similares a outras proteínas de efluxo envolvidas na resistência multidroga. 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 observado por PCR, apresentando uma correlação com as técnicas de diluições em ágar e meios de cultura já utilizadas. Assim, sua identificação em cepas isoladas de amostras clínicas pode ser necessária para a definição do tratamento a ser empregado nos pacientes, favorecendo um melhor resultado contra as infecções causadas por estes microrganismos (BEBEAR e KEMPF, 2005; BEETON, CHALKER et al., 2009).

Isolados de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum* tetraciclina resistentes contém sequências homólogas de determinante tetM. A resistência a tetraciclina *in vitro* está associada com falha na terapia em erradicar *M. hominis* e *U. urealyticum* do trato genital humano (BOUTHEINA, AISSANI et al., 2012).

O elemento genético tetM codificado no seu genoma tem sido isolado em todas as estirpes resistentes as tetraciclinas, porém em um estudo onde foram identificados 61 isolados tetM positivos, foi encontrado um isolado clínico de *Ureaplasma urealyticum* susceptível a tetraciclina e doxiciclina. O sequenciamento do gene tetM não revelou mutações em sua sequência que poderiam contribuir para a incapacidade protéica de mediar resistência a tetraciclina e não houve qualquer alteração no promotor endógeno do gene tetM que pudesse

ter cessado a expressão da proteína, portanto não se explica a susceptibilidade deste isolado tetM positivo (BEETON, CHALKER et al., 2009).

O relato de isolados susceptíveis as tetraciclinas contendo determinante tetM já fora registrado anteriormente. DÉGRANGE e colaboradores identificaram dois isolados de *Mycoplasma hominis* tetM positivos susceptíveis a tetraciclina (DÉGRANGE, RENAUDIN et al., 2007). Um destes isolados tinha uma inserção de 1.260 pb na sequência do peptídeo líder (provavelmente impedindo o sucesso da transcrição), enquanto nenhuma mutação foi encontrada dentro do gene tetM ou região promotora deste. (BEETON, CHALKER et al., 2009 encontrou resistência concomitante tanto a tetraciclina quanto a doxiciclina em isolados tetM positivos, o que contrasta com os resultados encontrados por BLANCHARD e colaboradores que identificaram 21 isolados clínicos de *Ureaplasma* sp. Resistentes a tetraciclina e apenas 8 eram resistentes à doxiciclina, 2 apresentavam sensibilidade intermediária e 11 foram susceptíveis. Foi proposto que a doxiciclina é menos indutora de tetM do que a tetraciclina (BLANCHARD, CRABB et al., 1992).

2.9.2 Caracterização molecular de isolados resistentes as quinolonas

Mutações nas subunidades das enzimas DNA girase bacteriana (genes *gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (genes *parC* e *parE*) conhecidos como regiões determinantes de resistência as quinolonas caracterizam a resistência a estas. Estudo realizado por Beeton et al, 2009 encontrou uma mutação em um único par de base na posição 244 do gene *parC* resultando na alteração de códons e substituição de ácido aspártico por asparagina. Outros mecanismos de resistência que podem mediar resistência as quinolonas tem sido descritos e incluem além da mutação dos genes da topoisomerase, diminuição da permeabilidade da membrana, efluxo ativo das drogas, a modificação por uma enzima inativadora de fluoroquinolonas ou ainda a presença de uma proteína QNR (ROBIESEK, STRAHILEVITZ et al., 2006). Em um estudo onde seis grupos diferentes investigaram um total de 32 isolados resistentes e mutações nos genes de *Ureaplasma* sp. associados com resistência a fluoroquinolona (BEBEAR, RENAUDIN et al., 2003; DUFFY, GLASS et al., 2006; GEIBDORFER, SANDNER et al., 2008). Dezenove dos 32 isolados fluoroquinolona resistentes investigados por estes grupos tinham a mesma mutação no gene *ParC*, S83L (ou S80L, se usar uma homologia para esta mesma posição em *Escherichia Coli*) (BEETON, CHALKER et al., 2009).

2.9.3. Caracterização molecular de isolados resistentes aos macrolídeos

Existem poucas informações disponíveis sobre os mecanismos de resistência a eritromicina em micoplasmas. A primeira caracterização molecular de um isolado clínico de *Ureaplasma* sp. resistente a eritromicina ocorreu em 2009 (BEETON, CHALKER et al., 2009). O mecanismo fisiológico da resistência a eritromicina foi demonstrado há 23 anos onde relatou-se a redução da ligação da eritromicina a ribossomos radiomarcados e comparou-se com uma estirpe susceptível (PALU, VALISENA et al., 1989). No entanto avanços tecnológicos tem permitido incrementar a investigação dos mecanismos moleculares. Um outro estudo identificou mutações que impedem a eritromicina de se ligar a porção 50 S ribossomal onde esta exerceria atividade bacteriostática através da inibição da síntese proteica (PEREYRE, SIRAND-PUGNET et al., 2009).

PEREYRE e colaboradores submeteram repetidamente (45-50x) uma cepa de referência de *U. parvum* a quantidade gradativamente crescentes de eritromicina e sequenciaram posteriormente genes associados a dois operons de 23S rRNA e a proteínas ribossomais L4 e L22. Também encontraram uma mutação no sítio alvo da eritromicina em torno da posição do nucleotídeo 2067 (2058 para *Escherichia coli*) e próximo do circuito de transpeptidação da peptidiltransferase no domínio V de um dos operons 23S rRNA e mutação adicional associada a proteína L4 e L22. Também foram identificadas uma série de mutações pontuais inseridas no segmento 23S rRNA de 18 isolados clínicos com diferentes graus de resistência para os macrolídeos josamicina, claritromicina, roxitromicina e azitromicina (PEREYRE, SIRAND-PUGNET et al., 2009).

BEETON, CHALKER et al., (2009) não encontraram nenhuma das mutações descritas nos isolados resistentes a eritromicina, mas encontrou uma deleção de dois aminoácidos na proteína L4 para um isolado altamente resistente a eritromicina (MIC > 64 mg/l). Há de se considerar ainda outros mecanismos como a metilação do DNA, a expressão de proteínas bacterianas que modifiquem os macrolídeos ou efluxo aumentado de fármacos através de canais iônicos podem ser responsáveis pelo aumento relativo da tolerância a eritromicina para estes isolados. KENNY e CARTWRIGHT (1993), anteriormente mostraram que a susceptibilidade a eritromicina foi reduzida em meio de crescimento ácido no entanto o pH do meio tinha que cair abaixo de 6,5 antes de esse efeito ser observado.

BEETON, CHALKER et al., 2009 realizaram seu estudo mantendo um pH em torno de 6,65; as MICs foram determinadas paralelamente a um lote de caldo U10 com PH 6,5 e os

resultados foram consistentes em testes repetidos. A sensibilidade reduzida portanto não poderia ser atribuída a um artefato de pH do caldo usado. As mutações na região altamente conservada L4 já foram registradas para isolados de *Escherichia coli* e pneumococos em outros estudos (CHITTUM e CHAMPNEY, 1994). Tanto uma mutação de substituição (G69C) e uma mutação de inserção (inserção de 6 pb entre os codons codificando Q67 e K68) foram encontrados em duas cepas de pneumococos resistentes (TAIT-KAMRADT, DAVIES et al., 2000). Os isolados clínicos foram encontrados pelo mesmo grupo constituído por um clone distinto, que continha uma substituição de 69GTG71 para 69TPS71 bem como um isolado, que continha uma inserção de 6-amino-ácido dentro da mesma região. Uma mutação semelhante (K63E) dentro de L4 de *E. coli* também foi encontrada associada com a resistência à eritromicina (CHITTUM e CHAMPNEY, 1994) e foi localizada adjacente à deleção dos locais descritos por BEETON, CHALKER et al., (2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a susceptibilidade de espécies de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. aos antimicrobianos doxiciclina, roxitromicina e ofloxacina .

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente cepas de micoplasmas conservadas por refrigeração, isoladas no período de março de 2011 a julho de 2012 nos laboratórios IPHM (Instituto de Patologia e Hematologia de Manaus), CDL (Centro de Diagnóstico Laboratorial- Manaus) e FMT-HVD (Fundação de Medicina Tropical - Heitor Vieira Dourado- Manaus).
- Avaliar a susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos doxiciclina 8 µg/ml, roxitromicina 4 µg/ml e ofloxacina 4 µg/ml.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção e armazenamento dos isolados

Foram utilizados 26 isolados de *Mycoplasma hominis* e 71 isolados de *Ureaplasma* sp. resultantes de cultivos positivos de amostras urogenitais, oriundos dos laboratórios IPHM, CDL e FMT-HVD no período de março de 2011 a julho de 2012. Estes isolados foram cultivados em caldo PPLO (BBL Difco®) e caldo BHI (BBL Difco®) com o pH do meio ajustado a 7,5 e enriquecidos com 20% (v/v) de soro de cavalo inativado e 10% (v/v) de extrato de levedura fresco e suplemento *Mycoplasma enrichment* com penicilina (BBL Difco®), fracionados 0,2 ml por tubo eppendorf em duplicata e estocadas em freezer a -70° C. O procedimento de preparo dos meios utilizados e sua formulação é apresentada no Anexo A.

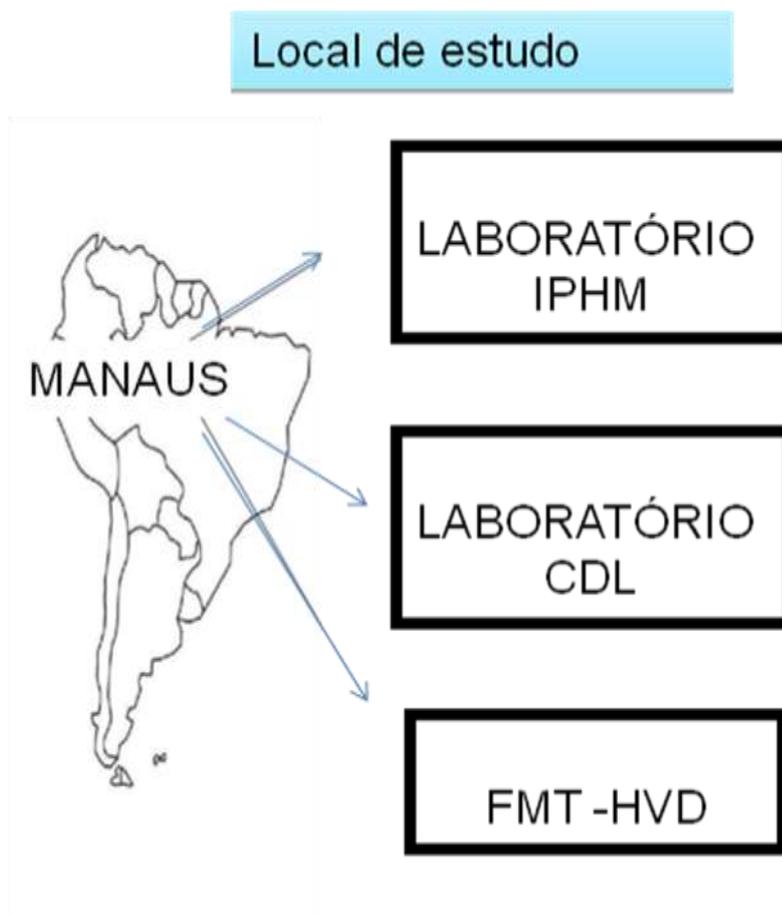
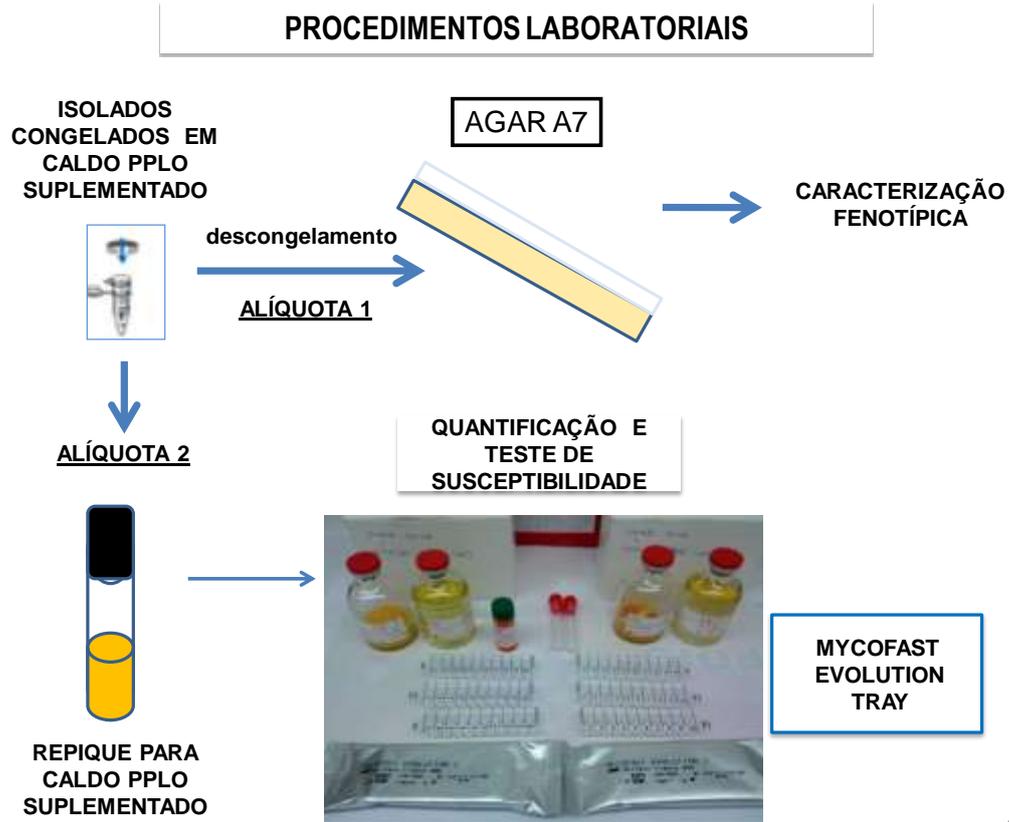


Figura 06. Locais de realização do estudo

4.2. Caracterização fenotípica dos isolados e teste de susceptibilidade a antimicrobianos.

Para a caracterização fenotípica dos isolados e realização dos testes de susceptibilidade procedeu-se o descongelamento mantendo as cepas em banho maria a temperatura de 37⁰C e diluindo-as em 05 ml de caldo PPLO e 05 ml de caldo BHI suplementado em duplicata. Em seguida os isolados foram processados de acordo com o fluxo abaixo descrito, que é também ilustrado na figura 05:

- *M. hominis* – subcultivo em meio líquido – caldo PPLO suplementado com arginina – MLA
- *Ureaplasma* sp. – subcultivo em meio líquido – caldo PPLO suplementado com uréia – U10
- Semeadura em meio sólido agar A7 e observação da morfologia colonial microscopicamente com aumentos de 100 x (Figura 06).
- Semeadura em *Mycofast evolution tray* para quantificação, identificação e teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Figura 07), cuja metodologia é apresentada no Anexo B.
- Semeadura em meios de cultivo líquidos com substratos específicos para caracterização fenotípica visando complementar a identificação conforme a tabela 04.



31

Figura 07. Fluxo de processamento dos isolados de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. após descongelamento.

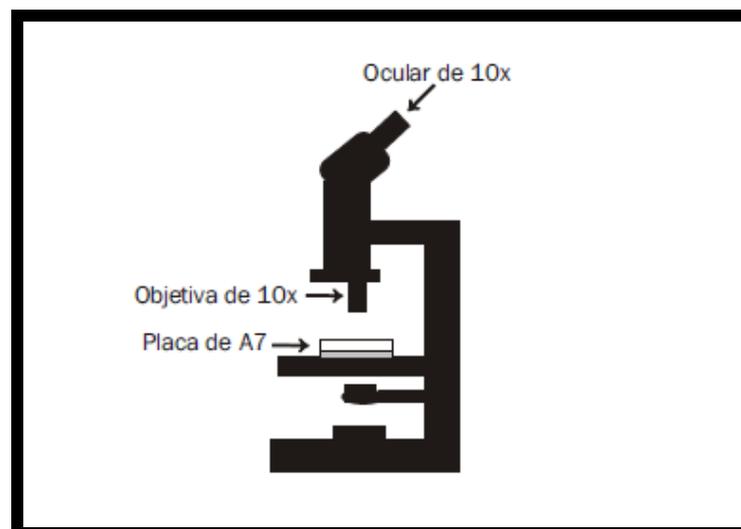


Figura 08. Avaliação microscópica da morfologia colonial

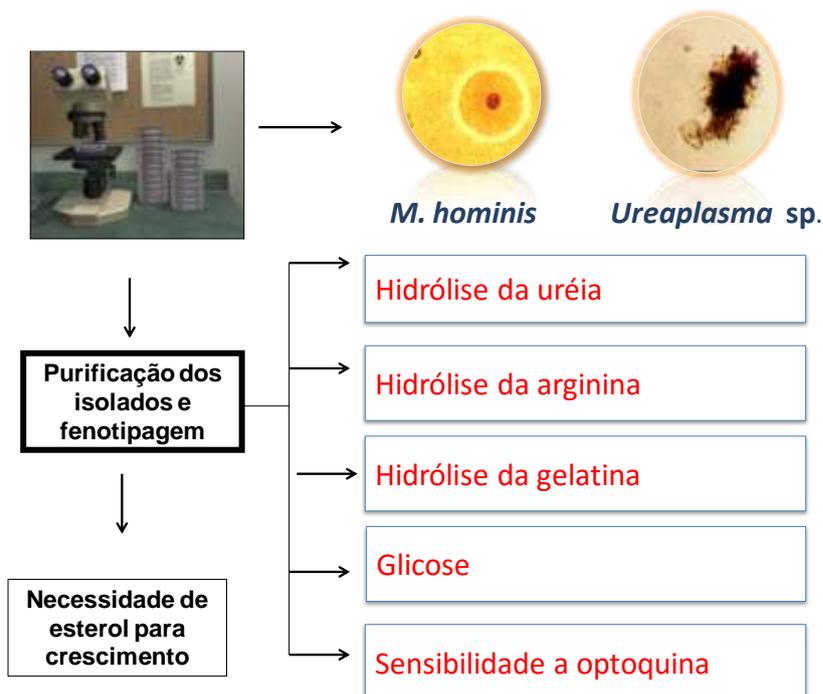


Figura 09. Caracterização fenotípica dos isolados.

O *Mycofast® Evolution* (Figura 10) é realizado em fileiras separadas de poços indicados para analisar 2 amostras em paralelo. Os poços estão em bandeja de 2 por 10, separados em 4 seções como demonstrado no quadro 04. A enumeração específica de isolados de *Ureaplasma sp.* é feita pela inclusão de lincomicina, nos 3 primeiros poços, que inibe o crescimento de *M. hominis* que pode estar presente. Para a contagem de *M. hominis* no poço 10, a eritromicina é incluída para inibir o crescimento de *Ureaplasma sp.*

Quadro 4. Fluxo do *Mycofast® evolution 2* galeria *Mycofast evolution tray*

POÇOS	ENUMERAÇÃO
1 – 3	Enumeração de <i>Ureaplasma sp.</i> entre 10^3 e 10^5 UTC/ml
4 – 6	Teste de resistência a antibiótico para <i>Ureaplasma sp.</i> e <i>M. hominis</i> contra doxiciclina 8 µg/ml (D), roxitromicina 4 µg/ml (ROX) e ofloxacina 4 µg/ml (OFX)
7 - 9	Identibiotique®: Identificação de <i>Ureaplasma sp.</i> e <i>M. hominis</i> através do perfil de resistência a: lincomicina (L), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT) e eritromicina (E)
10	Enumeração de <i>M. hominis</i> = 10^4 UTC/ml

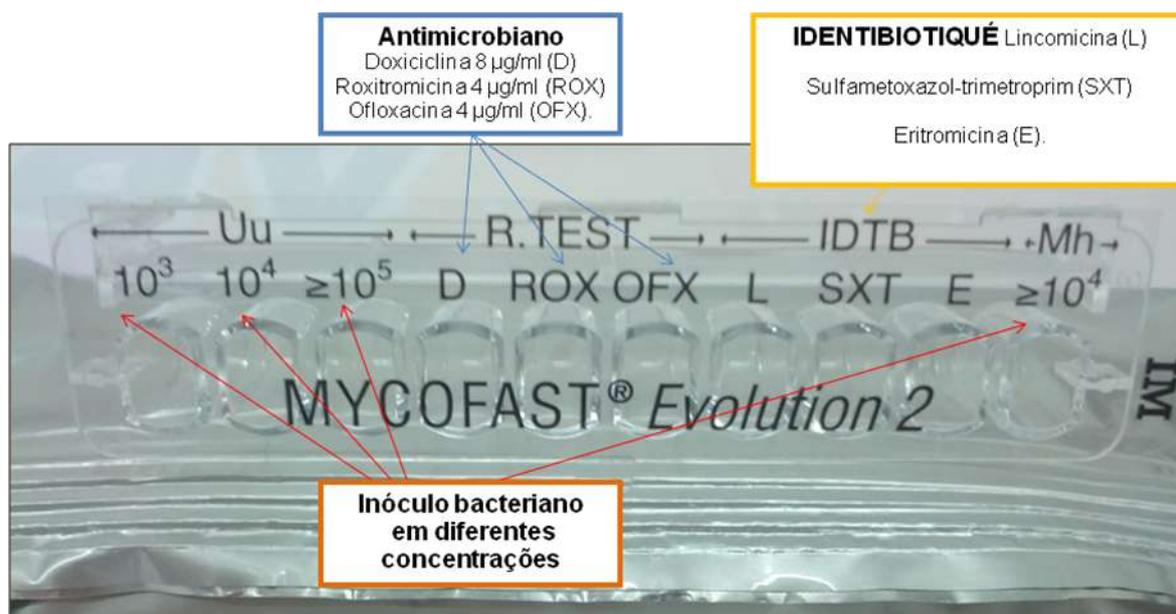


Figura 10. Sistema *Mycofast® Evolution Tray* para quantificação dos isolados de *Ureaplasma sp.* e *M. hominis*

O controle de qualidade dos meios de cultivos e a reprodutibilidade dos procedimentos adotados foi avaliada utilizando cepas obtidas da *American Type Collection Culture* (ATCC) de acordo com o quadro 05.

Quadro 05. Cepas ATCC utilizadas para o controle de qualidade dos procedimentos analíticos.

Organismos	ATCC	Depositor	GenBank
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	27817	Shepard et al.	AF270760
<i>Mycoplasma hominis</i>	PG 21	R.G. Wilttler	M24473

A caracterização fenotípica complementar foi realizada utilizando o protocolo de ALUOTTO, WITTLER et al., 1970; a padronização descrita pelo Comitê Internacional de Sistemática em Bacteriologia / Subcomitê de Taxonomia de Mollicutes (1995) e o protocolo estabelecido por BROWN, WHITCOMB e BRADBURY, 2007. As provas bioquímicas utilizadas são apresentadas no quadro 04. Os isolados após semeadura em caldo suplementados com os substratos específicos foram incubados a 37°C em atmosfera de CO₂ e observados por 3, 4 e 7 dias.

Quadro 04. Testes complementares para caracterização fenotípica dos isolados.

TESTE	<i>M. hominis</i>	<i>Ureaplasma sp.</i>
GLICOSE	-	-
OF-TESTE GLICOSE	-	-
HIDRÓLISE DA ARGININA	+	-
HIDRÓLISE DA GELATINA	-	
SUSCETIBILIDADE A OPTOQUINA	S	R
URÉIA	-	+
ATMOSFERA DE CRESCIMENTO	Microaerofilia	Microaerofilia

S=Sensível, R= Resistente, (-) = negativo, (+) = positivo

4.3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *R Development Core Team* (2012), Versão 2.14.2. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste Z unilateral e X^2 para diferença de proporções. O nível de significância adotado foi de p inferior a 0,05. O p valor para os percentuais de resistência das estirpes avaliadas foi obtido considerando o percentual de isolados susceptíveis x isolados resistentes para cada uma das drogas testadas. A resistência cruzada entre as drogas foi avaliada por análise de variância - ANOVA. Os gráficos foram elaborados utilizando o software *Graphprisma*.

5. RESULTADOS

A caracterização fenotípica dos isolados armazenados identificados previamente como *Ureaplasma* sp. (78) e *Mycoplasma hominis*. (29), evidenciou 71 isolados de *Ureaplasma* sp. e 26 isolados de *Mycoplasma hominis*, de acordo com os dados apresentados nas Tabela 01 e 02.

Tabela 1. Caracterização fenotípica dos isolados armazenados de *Mycoplasma hominis*.

TESTE	26 ISOLADOS	02 ISOLADOS	01 ISOLADO
GLICOSE	-	+	-
OF-TESTE GLICOSE	-	+	+
HIDRÓLISE DA ARGININA	+	+	-
HIDRÓLISE DA GELATINA	-	-	-
SUSCETIBILIDADE A	S	S	S
OPTOQUINA			
URÉIA	-	-	-
	<i>M. hominis</i>	<i>Mycoplasma</i> sp.	<i>Mycoplasma</i> sp.

Tabela 2. Caracterização fenotípica dos isolados armazenados de *Ureaplasma* sp.

TESTE	71 ISOLADOS	06 ISOLADOS	01 ISOLADO
GLICOSE	-	-/+	-
OF-TESTE GLICOSE	-	-/+	+
HIDRÓLISE DA ARGININA	-	-/+	-
HIDRÓLISE DA GELATINA			-
SUSCETIBILIDADE A	R	R	R
OPTOQUINA			
URÉIA	+	+	+
	<i>Ureaplasma</i> sp.	Isolados mistos	Forma L de <i>Proteus</i> sp.

Os isolados não identificados como *Mycoplasma hominis* foram caracterizados como *Mycoplasma* sp. e excluídos do teste de susceptibilidade.

Os 97 isolados bacterianos armazenados durante o período de março de 2011 a julho de 2012, identificados através de caracterização fenotípica, como *Mycoplasma hominis* (26) e *Ureaplasma* sp. (71) foram submetidos a testes de susceptibilidade através do sistema *Mycofast evolution tray*. A figura 11 ilustra algumas galerias e os respectivos resultados do teste de susceptibilidade. Os resultados da avaliação da susceptibilidade dos isolados são apresentados nas tabela 03 e 04 e no gráfico 01.

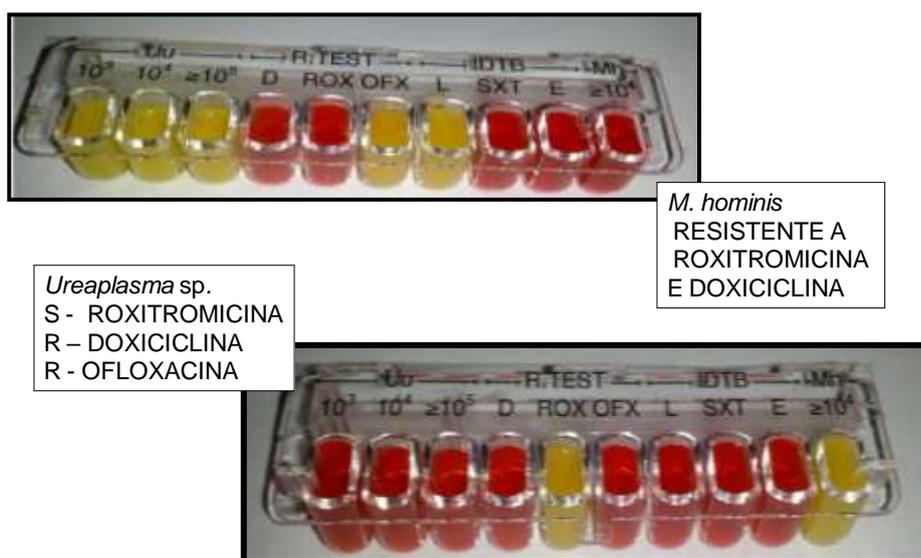


Figura 11: Galerias de *Mycofast evolution tray* após 48 h de inoculação com isolados de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp.

Tabela 3. Resistência de diferentes isolados de *Mycoplasma hominis* a doxiciclina (Tetraciclinas), roxitromicina (Macrolídeo) e ofloxacina (Fluorquinolona), Manaus, Amazonas, Brasil (n=26).

Antimicrobiano	n (%)	P valor *	IC 95%	X ²
doxiciclina (08 µg/ml)	08/26 (30,8)	0,005	0,13 - 0,64	7,7
roxitromicina (04 µg/ml)	15/26 (57,7)	0,009	0,37 - 0,76	6,8
ofloxacina (04 µg/ml)	12/26 (46,1)	0,551	0,26 - 0,66	0,35

*Diferença significativa com $p < 0.05$

Tabela 4. Resistência de diferentes isolados de *Ureaplasma* sp. a doxiciclina (Tetraciclina), roxitromicina (Macrolídeo) e ofloxacina (Fluorquinolona), Manaus, Amazonas, Brasil (n=71).

Antimicrobiano	n (%)	P valor *	IC 95%	X ²
doxiciclina (08 µg/ml)	20/71 (28,2)	9,01 ⁻¹⁶	0,18 – 0,40	65
roxitromicina (04 µg/ml)	02/71 (2,8)	<2,2 ⁻¹⁶	0,0049-0,1072	2289
ofloxacina (04 µg/ml)	32/71 (45,0)	0.1182	0,33 – 0,57	2,4

*Diferença significativa com p<0.05

A resistência de isolados de *M. hominis* e *Ureaplasma* sp. foi comparada com o objetivo de avaliar a magnitude da resistência frente as três drogas testadas, para cada uma das espécies, os resultados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Magnitude de resistência dos isolados de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp a. doxiciclina, roxitromicina e ofloxacina, Manaus, Amazonas, Brasil.

Antimicrobiano	<i>M. hominis</i> p valor	<i>Ureaplasma</i> sp. p valor
roxitromicina x doxiciclina	0.05064	2.985 ⁻⁰⁵
doxiciclina x ofloxacina	0,2542	0,03659
roxitromicina x ofloxacina	0,405	3,646 ⁻⁰⁹

ANOVA one-way, diferença significativa com p<0.05

A resistência cruzada entre as drogas foi avaliada, comparando a resistência entre doxiciclina + roxitromicina, doxiciclina + ofloxacina, roxitromicina + ofloxacina, doxiciclina + roxitromicina + ofloxacina para as duas espécies estudadas. Os resultados são apresentados na tabela 06 e podem ser observados no Gráfico 02.

Tabela 6. Resistência cruzada dos isolados de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma sp* a. doxiciclina, roxitromicina e ofloxacina, Manaus, Amazonas, Brasil.

Antimicrobiano	<i>M. hominis x Ureaplasma sp.</i>	IC 95%
	p valor	
doxiciclina + roxitromicina	0,5986	-0,062 - 0,139
doxiciclina + ofloxacina	0,1818	-0,270 - 0,010
roxitromicina + ofloxacina	0,0251	- 0,028 – 0,407
doxiciclina + roxitromicina + ofloxacina	0,0251	- 0,028 – 0,307
Susceptibilidade as três drogas	0,05	- 0,461 - - 0,028
doxiciclina	1,0	-0,170 – 0,120
roxitromicina	0,0002	0,043 – 0,419
ofloxacina	0,2361	-0,324 – 0,047

ANOVA one-way, diferença significativa com $p < 0.05$; IC = intervalo de confiança.

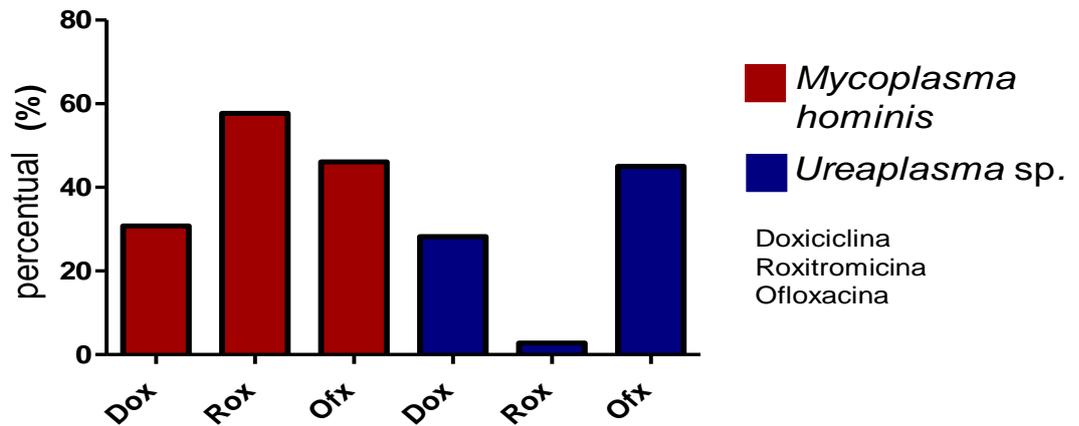


Gráfico 1. Resistência isolada de *Ureaplasma sp.* e *Mycoplasma hominis* a antimicrobianos.

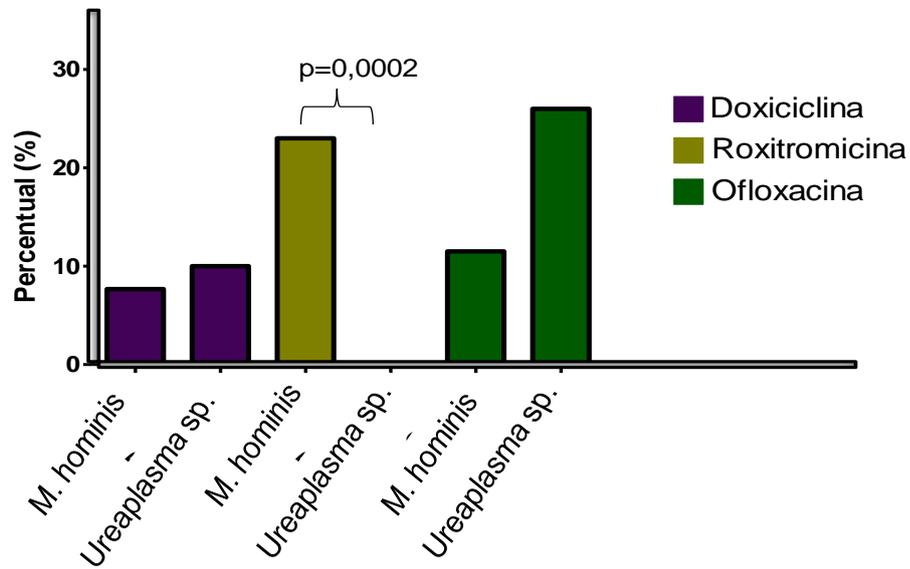


Gráfico 2 - Percentual de monoresistência a drogas de *M. hominis* x *Ureaplasma* sp.

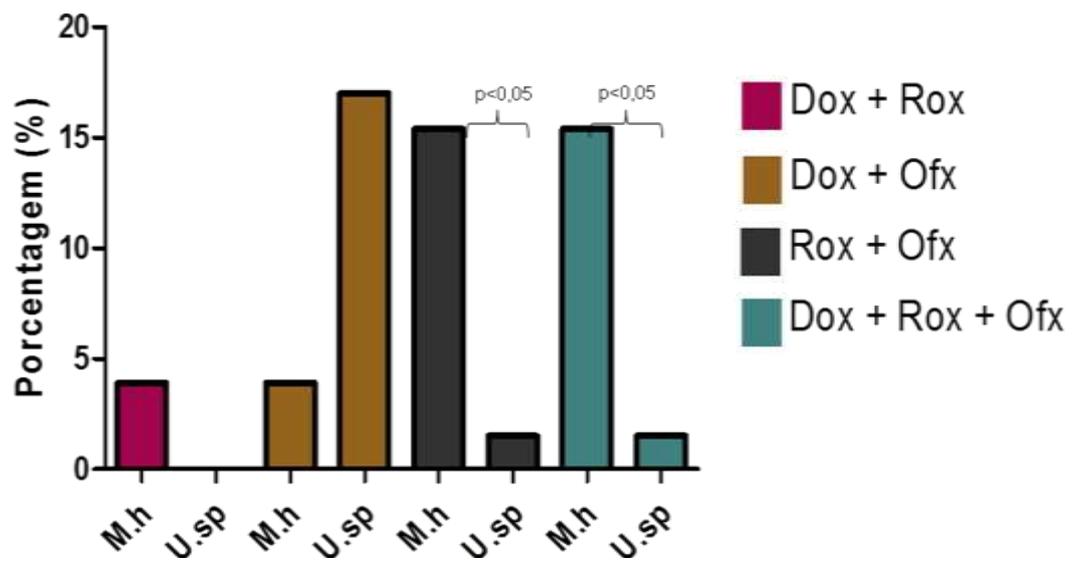


Gráfico 03. Resistência cruzada de isolados de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. a doxicilina (dox), roxitromicina (rox) e ofloxacina (ofx).

6. DISCUSSÃO

Ao comparar a resistência de *Mycoplasma hominis* frente a doxiciclina e roxitromicina verificamos que a primeira não é significativamente mais ativa que a roxitromicina, também não há significância estatística entre a resistência a doxiciclina e ofloxacina para *M. hominis* e nem para roxitromicina e ofloxacina.

Analisando a resistência dos isolados de *Ureaplasma* sp. frente a doxiciclina e roxitromicina, verificamos que a roxitromicina é expressivamente mais efetiva que a doxiciclina ($p=2,985^{-05}$) e ofloxacina ($p=3,646^{-09}$).

A resistência cruzada entre doxiciclina + roxitromicina e doxiciclina + ofloxacina não é estatisticamente significativa para ambas as espécies ($p > 0,05$). A resistência cruzada entre roxitromicina + ofloxacina é estatisticamente significativa para *M. hominis* quando comparamos com *Ureaplasma* sp. ($p= 0,02515$). Ao avaliar a resistência cruzada a três drogas (doxiciclina+roxitromicina+ofloxacina) concluímos que *M. hominis* apresenta maior resistência cruzada quando comparado com *Ureaplasma* sp. ($p=0,02515$). O percentual de isolados sensíveis a todos os antimicrobianos foi igual para ambas as espécies ($p=0,05$).

KRAUSEE e SCHUBERT (2010), observaram que significativamente mais isolados de *M. hominis* (aproximadamente 10-13%) do que de *Ureaplasma* sp. (aproximadamente 1-3%) mostravam-se resistentes a tetraciclina. Embora neste estudo a resistência a doxiciclina apresente-se mais elevada, 30,8% para *M. hominis* e 28,2% para *Ureaplasma* sp., não há diferença significativa para ambas as espécies. Resultados anteriores em diferentes países tem mostrado dados similares aos obtidos neste estudo, apontando crescente aumento de resistência as tetraciclina (JAGIELSKI, 1979; KOUTSKY, STAMM et al, 1983; CUMMINS e McCORMACK, 1990; BLANCHARD, CRABB et al, 1992; KENNY e CARTWRIGHT, 1994; KILIC, KAYGUSUZ et al, 2004).

Segundo TARASKINA, SAVICHEVA et al, (2002) a alta percentagem de microrganismos contendo gene tetM na vagina poderia favorecer a transferência deste determinante de resistência. A resistência de cepas de *M. hominis* a doxiciclina encontrada deve ser alvo de estudos mais aprofundados visando verificar a presença de plasmídeo tetM e outros determinantes genéticos de resistência considerando que já foram detectados isolados tetM positivos susceptíveis a tetraciclina (DÉGRANGE, RENAUDIN et al, 2007, BEETON, CHALKER et al, 2009), o que demonstra a relevância do teste de susceptibilidade e a importância de sua associação as técnicas moleculares como a PCR na avaliação da resistência a antibióticos.

Embora as quinolonas representem um grupo de fármacos antimicrobianos com boa efetividade contra *M. hominis*, nossos dados apontam consideráveis chances de falha terapêutica com a prescrição destes agentes. Resultados semelhantes tem sido encontrados em estudos anteriores: Na China (1999-2004), a taxa de resistência às fluoroquinolonas (ofloxacina, ciprofloxacina) foi muito elevada (> 50%) aumentando ao longo do período do estudo (XIE e ZHANG, 2006). Na Itália foi detectado 27,7% de resistência para *M. hominis* e 27,3% para *Ureaplasma* sp. (LELI, MENCACCI et al, 2012). Enquanto que na Romênia encontrou-se 16,0% de resistência de ofloxacin para *Ureaplasma* sp. (MIHAI, BOGDAN et al, 2011).

Na Alemanha foi encontrado 30% e 65% de resistência a ciprofloxacina em cepas de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. respectivamente, cujo estudo abrangeu um período de 20 anos (KRAUSEE e SCHUBERT, 2010), mas ofloxacina foi eficaz contra ambas as espécies (> 95% de sensibilidade). Esses últimos dados contrastam com os resultados encontrados neste estudo e expressam a variação global da resistência e a necessidade de se avaliar o perfil de susceptibilidade para a seleção de terapia apropriada.

O uso irrestrito e inapropriado de fluoroquinolonas na terapia das infecções do trato urinário poderia ser um fator determinante para as altas taxas de resistência a ofloxacina encontradas. Os resultados obtidos evidenciam a necessidade de avaliação da susceptibilidade a outros representantes do grupo das fluorquinolonas, como Moxifloxacina já que diversos estudos tem demonstrado a alta atividade de Moxifloxacina, principalmente nas falhas de tratamento usando doxiciclina ou azitromicina (TWIN, JENSEN et al, 2012), o que a torna uma droga em potencial para a terapia de infecções urogenitais ocasionadas por *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* e *Mycoplasma hominis*.

Diversos estudos tem apontado níveis variáveis de resistência em *M. hominis* a diferentes representantes da classe dos macrolídeos. MARTINEZ, CASTILHO et al, (2006) encontraram 28,57% de resistência a roxitromicina para *M. hominis*. Neste estudo observamos um percentual bem mais elevado (57,5%), embora a roxitromicina não seja uma droga usualmente prescrita na região norte do país. Tal achado evidencia que a inatividade pode se estender a outros representantes deste grupo de antibacterianos, tais como a claritromicina e a azitromicina, esta última amplamente prescrita.

Embora roxitromicina tenha se mostrado altamente efetiva para os isolados de *Ureaplasma* sp. não se pode afirmar se é conveniente predizer esta susceptibilidade a análogos dos macrolídeos (azitromicina, claritromicina e eritromicina) que aparentemente seriam uma

excelente alternativa para a terapêutica das infecções ocasionadas por este agente. Em todo caso, estudo desenvolvido por MARTINEZ, CASTILHO et al, (2006) evidenciaram a baixa resistência a macrolídeos (5,8% para azitromicina; 2,9% para claritromicina e 5,8% para a eritromicina). Esses dados assimilam-se aos encontrados em outras regiões do mundo. BEETON, CHALKER et al, (2009) encontraram a partir de isolados de *Ureaplasma* sp. obtidos de lavado brônquico alveolar de neonatos em um hospital universitário no Reino Unido, 1,6% de resistência a eritromicina, valores próximos dos encontrados em nosso estudo (2,8%).

Os isolados roxitromicina resistentes identificados neste estudo precisam ser melhor avaliados através de estudos moleculares a fim de determinar a prevalência de mutações nos genes relevantes associadas com a resistência.

A avaliação da susceptibilidade dos isolados a azitromicina seria necessária também para verificar sua eficácia em relação à doxiciclina, considerando que é uma alternativa de primeira escolha na terapia das uretrites não gonocócicas e não clamidiais na região norte.

7. CONCLUSÃO

- O presente trabalho é pioneiro no estudo da susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *M. hominis* e *Ureaplasma* sp. na região norte do Brasil.
- Os resultados obtidos evidenciam que os níveis de resistência detectados são elevados e apontam a necessidade de considerar sempre a possibilidade de detecção de micoplasmas com títulos superiores a 10^4 UTC (Unidades Trocadoras de Cor) associados a qualquer infecção do trato urogenital sob pena de falha no tratamento e recidiva dos sintomas.
- Considerando os menores níveis de resistência detectados para doxiciclina em relação a ofloxacina, a prescrição da primeira é mais indicada para infecções por *M. hominis* e a roxitromicina e seus análogos para *Ureaplasma* sp.
- Nossos resultados mostram que o regime empírico adotado para o tratamento de transtornos urogenitais, sobretudo uretrites não gonocócicas, pós gonocócicas e não gonocócicas e não clamidiais é ineficaz considerando a etiologia micoplásmica e os níveis elevados de resistência encontrados para doxiciclina e ofloxacina.
- Apesar das dificuldades no cultivo, quantificação e caracterização das espécies, bem como na padronização de testes de susceptibilidade é imprescindível o diagnóstico laboratorial das infecções por micoplasmas para que a clínica tenha embasamento para a terapêutica das mesmas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A estocagem dos isolados bacterianos possibilitou a avaliação da susceptibilidade a drogas, nosso objetivo futuro é implantar um teste de susceptibilidade antimicrobiana *in house* com metodologia baseada na inibição metabólica que propicie a redução dos custos da avaliação do perfil de susceptibilidade e possa ampliar o arsenal de drogas a serem testadas.

O material genético obtido a partir da extração de DNA bacteriano dos isolados poderá servir para estudos futuros que englobem determinantes genéticos de resistência.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A manutenção dos isolados bacterianos viáveis foi um dos fatores limitantes, uma vez que a interferência de inibidores de crescimento, como antibióticos ou anticorpos eventualmente presentes no soro no caldo utilizado como suplemento para o crescimento. A diluição foi umas estratégias encontradas para superar este impedimento, uma vez que a omissão desta diluição é uma das razões pelas quais alguns laboratórios têm dificuldade no isolamento dos micoplasmas, pois freqüentemente a amostra não-diluída é negativa, enquanto as diluições seguintes apresentam crescimento (47).

Outro fator limitante ao cultivo é o tempo pois as culturas são incubadas até duas semanas.

A impossibilidade de observar a correlação entre a prevalência de resistência entre os diferentes sorotipos de *Ureaplasma* sp. e as duas espécies conhecidas.

10. REFERÊNCIAS

- ABDULRAZZAK, A. A. e BAKR, S.S. Role of mycoplasma in male infertility. *East Mediterr Health J*, v. 06, p. 149-155, 2000.
- ALUOTTO, B.B, WITTLER, R.G., WILLIAMS, C.O., FABER, J.E. Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. *International Journal Systematic Bacteriology* v.20, P. 35–58, 1970
- BACZYNSKA, A. P., FUNCH, P. et al. Morphology of human Fallopian tubes after infection with *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis*—in vitro organ culture study. *Hum. Reprod.* v. 22, p. 968-979, 2007.
- BASEMAN, J.B. e TULLY, J.G. *Mycoplasmas: Sophisticated Reemerging and Burdened by Their Notoriety. Emerging Infectious Diseases*, v.3, n. 1, p. 21-32, 1997.
- BALÁZS, F., ESZTER, O., et al. Frequency and antibiotic resistance of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in genital samples of sexually active individuals. *Clinical Medicine* v. 42 p.152-156, 2011.
- BARYKOVA, Y. A., LOGUNOV, D. Y., et al. Association of *Mycoplasma hominis* Infection with Prostate Cancer. *Oncotarget* v.02, n.04, p. 289-297, 2007.
- BAYRAKTAR, M. R., OZEROL, I. H. et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *International Journal of Infectious Diseases*. v. 14, p. 90-95, 2010.
- BÉBÉAR, C., DE BARBEYRAC, B. et al. Mycoplasmas in HIV-1 seropositive patients *Lancet*, v. 341, p.758-759, 1993.
- BEBEAR, C. M., KEMPF, I. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance. In A. Blanchard and G. F. Browning (ed.), *Mycoplasmas: pathogenesis, molecular biology, and emerging strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham, United Kingdom. p. 535-568, 2005.
- BEBEAR, C. M., RENAUDIN, H. et al. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations in clinical isolates of *Ureaplasma sp.* and *Mycoplasma hominis* resistant to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.47, p. 3323-3325, 2003.
- BEETON, M. L., CHALKER, V. J. et al. Comparison of full gyrA, gyrB, parC and parE gene sequences between all *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non-resistance polymorphism. *J. Antimicrob. Chemother.* v.64, n.3, p.529-538, 2009.
- BJARTLING, C., OSSER, S. et al. The association between *Mycoplasma genitalium* and pelvic inflammatory disease after termination of pregnancy. *BJOG* v.117, p. 361-364, 2010.
- BLANCHARD, A. e BROWING, G. *Mycoplasmas: Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*. Horizon Bioscience, Wymondhan Norfolk, UK.: 603p., 2005.
- BLANCHARD, A., CRABB, D. M., et al. Rapid detection of tetM in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR: tetM confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline. *FEMS Microbiology Letters* v.95, n.2-3, p. 277-281, 1992.

- BOUTHEINA, B. A. M., AISSANI, N. et al.. Evidence for the predominance of a single tet(M) gene sequence type in tetracycline-resistant *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* isolates from Tunisian patients. *Journal of Medical Microbiology*, v.61, p. 1254-1261, 2012.
- BROWN, D.R.; WHITCOMB, R.F. e BRADBURY, J.M. Revised Minimal Standards for Description of New Species of the Class *Mollicutes* (Division Tenericutes). *Int. J. of Syst. Evol. Microbiol.*; v.57, n. 11, p.2703-2719, 2007.
- BRYSKIER, A. Roxithromycin: review of its antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* v.41B, p. 1-21, 1998.
- CASSEL, G. H., WAITES, K. B. et al. *Ureaplasma urealyticum* Intrauterine Infection: Role in Prematurity and Disease in Newborns. *Clinical Microbiology Reviews* v. 06, n.1, p. 6-87, 1993.
- CHANOCK, R. M. *Mycoplasma* infections of man. *N Engl J Med* v.273, p.1199, 1965
- CHOPRA, I. Glycylcyclines: third-generation tetracycline antibiotics. *Curr Opin Pharmacol.* v.1, n.5, p. 464-469, 2001.
- CHITTUM, H. S. e CHAMPNEY, W. S. Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* v.176, p. 6192-6198, 1994.
- CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE, CLSI, (CLSI M43A 2011).
- CUMMINGS, M. e McCORMACK, W. Increase in Resistance of *Mycoplasma hominis* to Tetracyclines. *Antimicrob. Agents and Chemother.* v. 34, n. 12, p. 2297-2299, 1990.
- CUNHA, R.. Infecções por micoplasmas. In: Ferreira, A.W; Avila, S.L.M. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v.16, p. 186-194, 2001.
- DANDO, S. J., NITSOS, I. et al. The Role of the Multiple Banded Antigen of *Ureaplasma parvum* in Intra-Amniotic Infection: Major Virulence Factor or Decoy? *PLOS ONE* v.07, p. 1-15, 2012.
- DÉGRANGE, S., RENAUDIN, H. et al. Tetracycline Resistance in *Ureaplasma spp.* and *Mycoplasma hominis*: Prevalence in Bordeaux, France, from 1999 to 2002 and Description of Two tet(M)-Positive Isolates of *M. hominis* Susceptible to Tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 52, n.02, p.742-744, 2007
- DEGUCHI, T., YOSHIDA, T. et al. Association of *Ureaplasma urealyticum* (Biovar 2) with Nongonococcal Urethritis. *Sex Transm Dis* v.31, n.03, p.192-195, 2004.
- DeSILVA, N. S. e QUINN, P.A. Characterization of phospholipase A1, A2, C activity in *Ureaplasma urealyticum* membranes. *Mol Cell Biochem.* v. 201 n.1-2, p.159-167, 1999.
- DIENES, L. e EDSALL, G. Observations on the L-organism of Klieneberger. *Proc. Soc. exp. Biol.*(N. Y.), v.36, p.740-744, 1937.
- DUFFY, L., GLASS, J. et al. Fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma parvum* in the United States. *J. Clin. Microbiol.* v.44, p.1590-1591, 2006.

EATON, M.D, e MEIKLEJOHN, G, van H. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia. A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chicken embryos. *J Exp Med* v.79 p.649, 1944

EDWARD , A. e FREUND, E.A., Observations on Dienes' L type growth of bacteria. *Acta Path. Microbiol. Scandinav.*,v. 27, p, 159-171,1967.

EMBREE, J. *Mycoplasma hominis* in maternal and fetal infections. . *Ann NY Acad Sci* v.549, p.56-64, 1988.

FONSECA, L. T. Prevalência da infecção por *Ureaplasma urealyticum* e *parvum* em recém-nascidos de muito baixo peso. *tese de mestrado* UFRGS Porto Alegre Brasil 100 f.Renato Soybelmann Procianoy Orient.Rita de Cássia Silveira, 2011.

GHALEH, N., BEHBAHAN, G. et al. Susceptibilities of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates to antimicrobial agents in vitro. *Int. J. Poultry Sci.* v.7 n.11, p.1058-1064, 2008.

GEIBDORFER, W., SANDNER, G . et al. *Ureaplasma urealyticum* meningitis in an adult patient. *J. Clin. Microbiol.* v.46, p. 1141-1143, 2008.

GIRÓN, J.A., LANGE, M. e BASEMAN J.B. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* v.64,p.197–208, 1996.

GLASS, J. I., LEFKOWITZ, E. J. et al. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* v.407, p. 757-762, 2000.

HANNAN, P. C. T. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet. Res.* v. 3, n.4, p.373-395, 2000.

HEDELIN, H. H., MARDH, P. A. et al. *Mycoplasma hominis* and Interstitial cystitis. *Sex Transm Dis* v. 10, p.327-330, 1983.

HENRICH, B., HOPFE , M., et al. The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an opp operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*. . *J Bacteriol* v.181, p.4873-4878, 1999.

HOPFE, M. e HENRICH, B. OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. *BMC Microbiol* v. 8, p.55, 2008.

HOPFE, M., DAHLMANN, T., HENRICH, B. et al. In *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. *BMC Microbiology* v.11, n.185, p. 1-9, 2011.

HORNER, P. J., THOMAS, B. et al. Do all men attending departments of genitourinary medicine need to be screened for non-gonococcal urethritis? *Int. J. STD AIDS* v.13, p. 667-673, 2002.

HUANG, C., LIU, Z. et al. Susceptibility of mixed infection ou *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* to seven antimicrobial agents and comparison with that of *Ureaplasma* infection. *J. Huazhong Univ. Sci. Tech. med. Sci.* v.23 n.2, p. 203-205, 2003.

ITO, S., TSUCHIYA, T. et al. Prevalence of genital mycoplasmas and ureaplasmas in men younger than 40 years-of-age with acute epididymitis. *International Journal of Urology* v.19, n.3, p. 234-238, 2012.

JALIL, N., DOBLE, A. et al. Infection of the epididymis by *Ureaplasma urealyticum* *Genitourin. Med.* v.62, p.367-368, 1988.

JAGIELSKI, M. Sensitivity of *Mycoplasma hominis* to some antibiotics. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 31:225-237, 1979.

KEANE, F. E., THOMAS, B. J. et al. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. *Int. J. STD AIDS* v.11, p.356-360, 2000.

KENNY, G. E. e CARTWRIGHT, F.D. Effect of pH, inoculum size, and incubation time on the susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* to erythromycin in vitro. *Clin. Infect. Dis.* v.17(1):p. 215-218, 1993.

KENNY, G. E., e CARTWRIGHT, F. D. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to new glycylicyclines in comparison with those to older tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.38 p.2628–2632, 1994.

KENNY, G.E. e CARTWRIGHT, F.D. Susceptibilities of *Mycoplasma hominis*, *M. pneumoniae*, and *Ureaplasma urealyticum* to GAR-936, Dalfopristin, dirithromycin, evernimicin, gatifloxacin, linezolid, moxifloxacin, quinupristin-dalfopristin, and telithromycin compared to their susceptibilities to reference macrolides, tetracyclines, mand quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.45 n.9, p. 2604–2608, 2001.

KHAN, J., FARZAND, R. et al. Antibiotic sensitivity of human genital mycoplasmas. *African Journal of Microbiology Research* v.04 n.9, p.704-707, 2010.

KILIC, D., S.KAYGUSUZ, et al. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in patients with non gonococcal urethritis. *Jpn J Infect Dis*, v. 57, p. 17-20, 2004.

KIM, C. J., R. ROMERO, et al. The frequency, clinical significance, and pathological features of chronic chorioamnionitis: a lesion associated with spontaneous preterm birth. *Modern Pathology* v.23, p.1000-1011, 2010.

KRAUSSE, R. e SCHUBERT, S. In-Vitro Activities of Tetracyclines, Macrolides, Fluoroquinolones and Clindamycin against *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma ssp.* isolated in Germany over 20 years. *Clin Microbiol Infect.* v.16 n.11, p.1649-1655, 2010.

KILIAN, M. e FREUNDT, E.A. Exclusive Occurrence of and Extracellular Protease Capable the Hinge Region of Human Immunoglobulin A1 in strains of *Ureaplasma urealyticum*. *Isr J Med Sci*, v.20 n.10, p.938-941, 1984.

KONEMAN, E. e ALLEN, S. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido*, Ed. Médica Panamericana, 714 p., 2008.

KOUSTSKY, L. A., STAMM, W. E. et al. Persistence of *Mycoplasma hominis* after therapy: importance of Tetracycline resistance and of co-existing vaginal flora. *Sex. Transm. Dis.* v.10, P.374-381, 1983.

LELI, C., MENCACCI, A. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in a population of Italian and immigrant outpatient. *Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive* v. 20, p. 82-87, 2012.

LO, S.C.; HAYES, M.M. et al. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. *The Lancet*, v. 338, p. 1415–1418, 1991.

MACKENZIE, C. R., NISCHIK, N. et al. Fatal outcome of a disseminated dual infection with drug-resistant *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma parvum* originating from a septic arthritis in an immunocompromised patient. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, p.307-309, 2010.

MANDAR, R., RAUKAS, E. et al. Mycoplasmas in semen of chronic prostatitis patients. *Scand. J. Urol. Nephrol.* v.39, p.479-482, 2005.

MANUAL DE CONTROLE DAS DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS -DST, Série Manuais, n. 68, Ministério da Saúde, 4 ed. Brasília-DF, 2006.

MARDASSI, B. B., AYARI, H. et al. Genetic variability of the P1209 surface protein gene of *Mycoplasma hominis* isolates recovered from Tunisian patients with uro-genital and infertility disorders. *BMC Infect Dis* v.7, p. 142, 2007.

MARTINEZ, R., CASTILLO, T. et al. Susceptibilidad de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* ante diferentes antibióticos. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, v.06 n.02, p. 2006.

MAVEDZENGE, S. N. e WEISS, H. A. Association of *Mycoplasma genitalium* and HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *AIDS* ,v.23 n.05, p. 611-620, 2009.

McGOWIN, C. L., MA, L, et al. Secretion from Human Genital Epithelial and 6 To Elicit Proinflammatory Cytokine Activates NF- κ B via Toll-Like Receptors 2 Mycoplasma genitalium-Encoded MG309 Cells. *Infect. Immun.* v.77 n.3, p. 1175-1181, 2009.

MENACHEN, B. G., HIMMELREICH, R. et al. The thioredoxin reductase system of mycoplasmas. *Microbiology* v.143 n.6, p.1933-1940, 1997.

MIHAI, M., D. BOGDAN, et al. Antibiotic Susceptibility Profiles of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* Isolated During a Population-based Study Concerning Women Infertility in Northeast Romania. *Brazilian Journal of Microbiology* v.42, p. 256-260, 2011.

MYGIND, T., BIRKELUND, S. et al. Characterization of the variability of a 75-kDa membrane protein in *Mycoplasma hominis*. *FEMS Microbiol Let* v.190, p.167-176, 2000.

MUHLRADT, P. F. MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infect. Immun.* v. 59 n.11, p.3969-3974, 1996.

NEKTARIA, K., BERSIMIS, S. et al. Incidence and antimicrobial susceptibilities of genital mycoplasmas in outpatient women with clinical vaginitis in Athens, Greece. *J. Antimicrob. and Chemother.* v. 62, n.1, p.122-125, 2008.

NOCARD, E. e ROUX, L. Le Microbe de la pleuropneumoniae. *Ann. Inst. Pasteur*, v.12, p.240-262, 1882.

ODENDAAL, H. J., SCHOEMAN, J. et al. Preterm labor is *Mycoplasma hominis* involved? *S Afr Med J* v.92, p.235-237, 2002.

OLIPHANT, C. e G. GREEN, Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician*, v.65 n.3, p. 455-464, 2002.

OPLUSTIL, C. P., ZOCCOLI, C.M., et al, *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*, Ed. Sarvier, 2^a. Ed., 314p. 2004.

PALU, G., VALISENA, S. et al. Mechanisms of macrolide resistance in *Ureaplasma urealyticum*: a study on collection and clinical strains. *Eur. J. Epidemiol.* v.05, p. 146-153, 1989.

PARALANOV, V., LU, J. et al. Comparative Genome Analysis of 19 *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* strains. *BMC Microbiology* v.12:88, 2012.

PATEL, M. A. e P. NYIRJESY, Role of Mycoplasma and Ureaplasma Species in Female Lower Genital Tract Infections. *Current Infectious Disease Reports* v.12, n.06, p. 417-422, 2010.

PEREYRE, S., SIRAND-PUGNET, P. et al. Life on Arginine for *Mycoplasma hominis*: Clues from Its Minimal Genome and Comparison with Other Human Urogenital Mycoplasmas. *PLoS Genetics* p.01-13, 2009.

POLLOCK, D.J., Williams, M.V. e McCELHANEY, 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* v. 23, p.269–354, 1997.

POVLSEN, K., THORSEN, P. et al. Relationship of *Ureaplasma urealyticum* Biovars to the Presence of Absence of Bacterial Vaginosis in Pregnant Women and to the Time of Delivery. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* v.20, n.01, p.65-67, 2001.

RAZIN, S. *The Prokaryotes: The Genus Mycoplasma and Related Genera (Class Mollicutes). The Prokaryotes PART 1, SECTION 1.2: 836-904, 2006.*

RAZIN, S., TULLY, J. G. et al. DNA Cleavage Patterns as Indicators of Genotypic Heterogeneity among Strains of *Acholeplasma* and *Mycoplasma* Species *Microbiology* v.129 n. 6, p. 1935-1944, 1983.

RAZIN, S. Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters* v. 100 n.1-3, p.423-431, 1992.

RAZIN, S.; YOGEV, D. e NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n.4, p. 1094-1156, 1998.

RAZIN, S. e HAYFLICK, L. Highlights of mycoplasma research—An historical perspective. *Biologicals* v.38, n.2, p. 183-190, 2010.

ROBERTSON, J. A. e STEMKE, G. W. Expanded serotyping scheme for *Ureaplasma urealyticum* strains isolated from humans. *J Clin Microbiol* v. 15, n.5, p. 873-878, 1982.

ROBIESEK, A., STRAHILEVITZ, J. et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* v.12, p. 83-88, 2006.

ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiological Reviews*, v. 83, p. 417-432, 2003.

SCHLICHT, M. J., LOVRICH, S. D. et al. High Prevalence of Genital Mycoplasmas among Sexually Active Young Adults with Urethritis or Cervicitis Symptoms in La Crosse, Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology* v.42, p.10, p. 4636-4640, 2004.

SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES GUIDELINES, STD Treatment Guidelines, CDC, Atlanta, 2010.

SHORT, V. L., P. A. TOTTEN, et al. Clinical Presentation of *Mycoplasma genitalium* Infection versus *Neisseria gonorrhoeae* Infection among Women with Pelvic Inflammatory Disease. *Clinical Infectious Diseases* v.48, p. 41-47, 2009.

SHORT, V. L., TOTTEN, P.A. et al. The demographic, sexual health and behavioural correlates of *Mycoplasma genitalium* infection among women with clinically suspected pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Infect* v.86, p.29-31, 2010.

SMITH, D. G. E., RUSSEL, W. C. et al. Adherence of *Ureaplasma urealyticum* to Human epithelial cells. *Microbiology* v.140, n.10, p. 2893-2808, 1994.

SHEPARD, M. C., LUCEFORD, C. D. et al. Occurrence of Urease in T Strains of *Mycoplasma*. *J Bacteriol.* v. 93, n.5, p.1513-1520, 1967.

SHEPARD, M. C. e LUNCEFORD, C.D. Effect of pH on Human *Mycoplasma* Strains. *J Bacteriol.* v.89, n.2, p. 265-270, 1965.

SHIMIZU, T., KIDA, Y. et al. *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF- κ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology* v.154 n.5, p. 1318 - 1325, 2008.

SIRAND-PUGNET, P., LARTIGUE, C. et al. Being Pathogenic, Plastic, and Sexual while Living with a Nearly Minimal Bacterial Genome. *Plos One* v.3, n.5, p. 744-758, 2007.

STYLER, M. e SHAPIRO, S.S. 1997. Styler M and Shapiro SS (1985) Mollicutes (mycoplasmas) in infertility. *FertilSteril* v.44, p.1-11, 1997.

TAIT-KAMRADT, A., DAVIES, T. et al. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.44, p. 3395-3401, 2000.

TARASKINA, A.E, SAVICHEVA, A. M. et al. Drift of tetM determinant in urogenital microbiocenosis containing mycoplasmas during treatment with a tetracycline antibiotic. *Bull. Exp. Biol. Med.* v.134 p.60-63, 2002.

TAYLOR-ROBINSON, D. e JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to Multicolored Butterfly. *Clinical Microbiology Reviews* v.24 n.3, p. 498-514, 2011.

TIMENETSKY, J., SANTOS, L. M. et al. Detection of Multiple Micoplasma Infection in Cells Culture by PCR. *Brazilian Journal of medical and Biological* 39: 907-914, 2006.

TWIN, J., JENSEN, J. S. et al. Transmission and Selection of Macrolide Resistant *Mycoplasma genitalium* Infections Detected by Rapid High Resolution Melt Analysis. *Plos One* v.7, n.4, p.1-8, 2012.

TAYLOR, P. Medical significance of mycoplasmas. Medical significance of mycoplasmas. In: Milles RJ, Nicholas RAJ, eds Methods in molecular biology, vol 104: *Mycoplasma protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc. p. 7-12, 1998.

WAITES, K.B., KATZ, B. et al. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* v.18, n.4, p.757-789, 2005.

WAITES, K. B., C., BÉBÉAR, M. et al. Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. 34 In: CUMITECH Eds. ASM press v.34, p.1-29, 2011.

WATSON, H. L., BLALOCK, D. K. et al. Variable antigens of *Ureaplasma urealyticum* containing both serovar-specific and serovar-cross-reactive epitopes. *Infect. Immun.* v. 58, n.11, p. 3679-3688, 1990

WOESE, C.R., MANILOFF, J. e ZABLEN, L.B. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.77, n.1, p.494-498, 1980.

XIE, X. e ZHANG, J. Trends in the rates of resistance of *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics and identification of the mutation site in the quinolone resistance-determining region in chinese patients. *FEMS Microbiol lett* v. 259, p. 181-186, 2006.

ZHU, C., LIU, J. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Chinese women with genital infectious diseases. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* v.78: p.406-407, 2012.

ZDRODOWSKA-STEFANOV, B., KOSOWSKA, W. et al. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. *Adv Med Sci* v. 51, p.250-253, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO

APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL