

---

INFECÇÃO POR *Mycoplasma pulmonis*  
EM RATOS WISTAR  
PROVENIENTES DE BIOTÉRIO

---

Juliana Tamires Goulart Tedesco, Solange Lúcia Blatt e Caio Maurício Mendes de Cordova<sup>1</sup>

RESUMO

*Mycoplasma pulmonis*, causador da Micoplasmose Respiratória Murina (MRM), é uma das espécies de micoplasmas mais patogênicas para roedores de laboratório. A morbidade e mortalidade dos animais infectados por este micoplasma pode ser elevada, especialmente nos estudos de longa duração ou em animais com infecção subclínica exacerbada pela experimentação. Desta maneira haverá interferência na interpretação dos resultados experimentais. No presente estudo foi avaliada a taxa de infecção por *M. pulmonis* em ratos provenientes do biotério da Universidade Regional de Blumenau criados para experimentação científica, por cultura e PCR. Dentre os 20 animais analisados, 15 (75%) apresentaram DNA de *M. pulmonis* no lavado broncoalveolar e duas amostras produziram colônias típicas em agar SP4. Os resultados obtidos evidenciaram uma alta taxa de infecção por micoplasma em ratos no biotério avaliado, apesar do reconhecimento desta problemática no país a partir da década de 1990.

DESCRITORES: Micoplasma. *Mycoplasma pulmonis*. Animais de laboratório. Roedores. PCR.

ABSTRACT

*Mycoplasma pulmonis* infection in Wistar rats from an animal house

*Mycoplasma pulmonis*, the agent of the Murine Respiratory Mycoplasmosis (MRM), is one of the most pathogenic mycoplasma species for laboratory rodents. Mortality and morbidity in infected animals may be elevated, especially in long term studies or in animals with subclinical infection exacerbated by experimental procedures. Therefore, its most significant impact may be due to the interference in the interpretation of experimental results. The aim of this work was to evaluate the rate of *M. pulmonis* infection in rats from the animal house of the Regional University of Blumenau, by culture and PCR, bred specifically for scientific experimentation purposes. Among the 20 animals studied, 15 (75%) had bronchoalveolar samples with positive result for *M. pulmonis* by PCR, and two presented growth in culture with SP4 medium. Our results demonstrate a high rate

---

1 Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Regional de Blumenau.

Endereço para correspondência: Caio Maurício Mendes de Cordova, Universidade Regional de Blumenau, Rua São Paulo 2171, Campus III, CEP 89030-000, Blumenau, SC, Brasil. E-mail: cmcordova@furb.br

Recebido para publicação em: 4/11/2010. Revisto em: 21/6/2011. Aceito em: 31/10/2011.

of mycoplasma infection in laboratory rats from the animal house of the university, in spite of the knowledge about this issue since the 1990's.

KEY WORDS: *Mycoplasma*. *Mycoplasma pulmonis*. Laboratory animals. Rodents. PCR.

## INTRODUÇÃO

Hoje mais de 150 espécies de mollicutes são conhecidas, número que aumenta a cada ano. Muitas espécies são patogênicas, infectando o homem, animais, plantas e insetos (3). Embora muitas espécies de micoplasma façam parte da microbiota, algumas podem causar doenças infecciosas, dependendo de vários fatores, tais como o sítio de colonização, o número e as cepas dos microrganismos, e o estado imunológico do hospedeiro (8).

As espécies mais patogênicas em roedores de laboratório são *Mycoplasma pulmonis* e *M. arthritis*. A principal doença causada por *M. pulmonis* é a Micoplasmose Respiratória Murina (MRM), cuja expressão é marcadamente influenciada por uma variedade de fatores inerentes ao ambiente, ao hospedeiro e ao microrganismo. Pode causar morbidade e mortalidade importante, especialmente em animais utilizados em estudos de longa duração, ou animais com infecção subclínica exacerbada por procedimentos experimentais (20). A MRM é comparável às manifestações patológicas de *M. pneumoniae* em seres humanos e de outros animais, sendo considerado o modelo experimental das micoplasmoses respiratórias (2). Entretanto, o impacto mais significativo da infecção por *M. pulmonis* pode dever-se à sua interferência na interpretação dos resultados experimentais obtidos com animais infectados. Estes microrganismos podem, por exemplo, alterar a função ciliar e a cinética celular (11), a inflamação neurogênica (14, 15), a ativação das células NK (9, 22) e a resposta imune local e sistêmica (20, 21), com indução da produção de várias interleucinas (5). Já *M. arthritis* induz uma doença aguda limitada, que pode ser sistêmica e passível de autoinfecção em ratos, e inclui a poliartrite séptica como uma manifestação primária (24).

No Brasil, apenas quatro estudos avaliaram a taxa de infecção por *M. pulmonis* em ratos provenientes de biotérios. Um estudo no Rio de Janeiro curiosamente encontrou uma taxa de infecção de 81,25% num biotério controlado, e de 25% em um biotério convencional (18). Outro estudo em São Paulo detectou taxas de infecção de 83,78% em um biotério sem barreiras microbiológicas, não sendo encontrada infecção em biotério com barreiras (23).

No Estado de Santa Catarina, bem como em todo o Sul do Brasil, não existem dados sobre as taxas de infecção por micoplasmas nos roedores criados em biotérios para fins de experimentação e o impacto destas infecções na modulação do sistema imune dos animais. Como foi visto, a presença destes micro-organismos infectando animais de laboratório pode acarretar interferências importantes nos experimentos que os utilizam. Além disso, estas infecções podem ser subclínicas,

ou mesmo assintomáticas, dificultando a percepção de sua real incidência. Mesmo estas infecções assintomáticas podem estar interferindo no sistema imune dos roedores, alterando os padrões de resposta observados nos experimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de infecção por *M. pulmonis* em ratos provenientes do biotério da Universidade Regional de Blumenau – FURB, por cultura e pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e amostras

Foram utilizados 20 ratos Wistar provenientes do Biotério da Universidade Regional de Blumenau – FURB, igualmente distribuídos entre machos e fêmeas. Trata-se de um biotério convencional, onde os animais são criados em área limpa, porém sem barreiras microbiológicas. Toda água e maravalha passa por processo de esterilização por autoclavagem antes de entrar na área limpa, bem como os dejetos sofrem processo de desinfecção com hipoclorito de sódio antes do descarte. O biotério atende a demanda de aulas práticas e pesquisa dos alunos dos cursos da Saúde e Biologia. São realizados exames periódicos (anuais) de rotina para a detecção de doenças infecciosas, bem como profilaxia para ecto e endoparasitas (semestral). O biotério produz atualmente ratos e camundongos. Para a pesquisa dos micoplasmas nos animais, foram obtidas amostras de lavado broncoalveolar com 2 mL de meio de cultura, após eutanásia com aplicação de tiopental. O procedimento de coleta das amostras foi feito de acordo com o protocolo recomendando por Cassel et al (1). Após eutanásia com superdosagem de tiopental (100 mg/kg de peso) e fixação do animal numa placa de dissecação, a região do ventre até a traquéia foi submetida a anti-sepsia com Etanol 70% e a pele foi aberta sobre a laringe, que foi exposta por excisão do músculo. A laringe foi fechada com pinça em sua extremidade superior e perfurada com agulha estéril acoplada à seringa para realização do lavado broncoalveolar. O presente trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade de Blumenau sob nº 018/09.

### Cultura de micoplasmas

Uma alíquota de 1,0 mL dos lavados broncoalveolares foi utilizada para a cultura de micoplasmas a 37°C em um volume total de 2 mL de meio SP-4 modificado sólido e líquido (PPLO broth base [Difco], Triptona [Oxoid], Peptona [Difco], cloridrato de L-arginina, vermelho de fenol [1%], suplemento VX, penicilina, 20% de soro fetal bovino, CRML 1066, extrato de levedura, e glicose). O meio sólido foi preparado acrescentando-se 1% de Agar Noble (Difco). A acidificação do meio pelo metabolismo da glicose, sem a presença de turvação, indica o crescimento de micoplasmas, revelado pelo indicador vermelho

de fenol. As amostras foram incubadas em estufa por até 30 dias em aerobiose, e observadas diariamente (7).

#### Extração e purificação do DNA para PCR

Alíquotas de 1,0 mL das amostras de lavado broncoalveolar foram centrifugadas em microtubos de 1,5 mL por 15 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspendido em 0,5 mL de tampão de lise (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,5%, pH 8,0) com 200 ug/mL de Proteinase K, e incubados a 56°C por uma hora, seguido de 10 minutos de incubação a 100°C para inativação da Proteinase K. Após a lise celular foi adicionado volume igual de Fenol tamponado com Tris (500 µL) para extração do DNA. Os tubos foram homogeneizados em agitador tipo vórtex por cerca de 1 min, e centrifugados a 12.000 g por 5 min. Após centrifugação foi retirada a fase fenólica (inferior) e adicionados 500 uL de fenol/clorofórmico/álcool isoamílico 25:24:1 tamponado com Tris; os tubos foram homogeneizados novamente por 1 min e centrifugados a 12.000 g por 5 min. Em seguida a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 50 µL de acetato de sódio 3M e 1 mL de etanol absoluto gelado, e os tubos foram incubado a -20°C por 16 hs para a precipitação do DNA. Os tubos foram centrifugados novamente a 12.000 g por 30 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, seguido de nova centrifugação por 15 min a 12.000 g. O álcool foi desprezado e os tubos foram colocados em estufa a 40°C para secar o DNA. Após a secagem foram adicionados 200 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e os tubos armazenados a -20°C para a conservação (17).

#### Diagnóstico Molecular

A detecção da infecção por *M. pulmonis* por método molecular foi realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A amplificação do DNA purificado foi realizada com 5 uL de amostra em 25 uL de reação, contendo 20 uM de cada oligonucleotídeo iniciador MpulF (5'-AGCGTTTGCTTCACTTTGAA-3') e MpulR (5'-GGGCATTTCTCCCTAAGCT-3') (10), 3,0 uM de MgCl<sub>2</sub>, 200 uM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) com 1,0 U de Taq DNA Polimerase em tampão de reação fornecido pelo fabricante (Invitrogen). A reação foi submetida a uma desnaturação inicial por 5 min a 95°C seguida de 30 ciclos de amplificação por 1 min a 95°C, 1 min a 53°C e 1 min a 72°C, com uma extensão final por 7 min. a 72°C. Os produtos de PCR (266 pb) foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo e transiluminação UV (17). Como controle positivo foi utilizada a cepa UABCTIP de *M. pulmonis* (Instituto Pasteur, Paris).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, uma alta percentagem dos animais estudados, ou seja, 75% (15/20) apresentou resultado positivo para pesquisa de *M. pulmonis* por PCR (Figura 1). Apenas duas amostras apresentaram crescimento no meio SP4, ambas com resultado negativo por PCR. Muitas amostras (17/20) apresentaram contaminação na cultura, demonstrada pela turvação intensa do meio. A metodologia de cultura, por utilizar meio de cultivo extremamente enriquecido, está sujeita ao crescimento de contaminantes que inviabilizam o crescimento dos micoplasmas, muito mais lento que a grande maioria das bactérias e fungos. Além disso, a metodologia da PCR em muitos casos se apresenta mais sensível que a cultura na detecção da presença de microrganismos infecciosos. No caso das amostras que apresentaram resultado positivo por cultura e resultado negativo na PCR, não se pode descartar a presença de eventuais inibidores da reação enzimática de amplificação do DNA. Entretanto, a causa mais provável é tratar-se de outra espécie de micoplasma, em razão de termos utilizado uma reação de PCR específica para *M. pulmonis*.

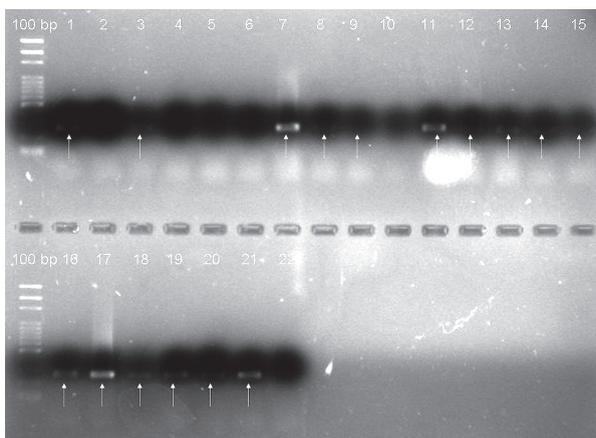


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR para *M. pulmonis* (266 bp – setas amarelas) corados com brometo de etídeo, em transiluminador UV. Controle positivo (21): DNA da cepa UABCTIP de *M. pulmonis*, controle negativo (22): H<sub>2</sub>O, 100 bp: DNA ladder (Invitrogen).

A MRRM causada por *M. pulmonis* é marcadamente influenciada por uma ampla variedade de fatores inerentes ao ambiente, ao hospedeiro e ao microrganismo. Pode causar morbidade e mortalidade significantes, especialmente em animais utilizados em estudos de longa duração, ou animais com infecção subclínica exacerbada por procedimentos experimentais (20). Entretanto, como

mencionamos, o impacto mais significativo da infecção por *M. pulmonis* pode dever-se à sua interferência na interpretação de resultados experimentais. O esforço para reduzir a infecção dos animais de laboratório por *M. pulmonis* obteve certo sucesso, porém não foi capaz de eliminá-la. Estudos de prevalência, da década de 80, ainda mostravam taxas de 5-20% em biotérios controlados (4, 20). Apesar de não haver relatos de estudos em maior escala nos últimos anos, alguns achados demonstram que a infecção por *M. pulmonis* ainda persiste, mesmo em biotérios bem controlados (13). No início da década de 1990 foi encontrada uma taxa de infecção significativa por micoplasmas em roedores de um biotério de São Paulo que não dispunha de barreiras microbianas (23). Mais recentemente, em outro biotério, foi observada uma taxa de infecção por *M. pulmonis* de 65% dos ratos analisados, com colonização inclusive de bioteristas que cuidavam dos animais (6). Ao redor do mundo, taxas similares tem sido encontradas, em relação ao presente estudo, como por exemplo em Taiwan, com 40% de infecção por *M. pulmonis* (12). Já em biotérios da Europa ocidental, onde se esperaria condições sanitárias melhores, as taxas podem ser tão baixas como 3% (13, 19). Os atuais níveis de infecção por *M. pulmonis* encontrados nos ratos provenientes do biotério da Universidade Regional de Blumenau impedem seu uso em modelos experimentais que abordem a avaliação de infecções por outros microrganismos e do sistema imune.

A elevada prevalência de *M. pulmonis* em um dos biotérios mais importantes no Estado de Santa Catarina para o fornecimento de animais para experimentação se constitui um problema grave, que necessita de medidas profiláticas e corretivas. Da mesma forma, estes dados servem de alerta aos demais biotérios e centros de pesquisa do país, que eventualmente não façam este tipo de monitoramento contínuo. A utilização de métodos moleculares no monitoramento dos biotérios pode constituir vantagem expressiva, uma vez que pode apresentar sensibilidade maior do que o método convencional de cultura. Altas taxas de infecção inutilizam estes animais para um grande número de experimentos científicos, principalmente aqueles que envolvem a resposta imune e inflamatória. Outros estudos estão sendo conduzidos por nosso grupo avaliando a taxa de infecção também em camundongos, bem como a presença de outras espécies importantes de micoplasmas, como *M. arthritidis*.

Parece essencial que os pesquisadores, no momento de planejar experimentos que utilizem a avaliação da resposta imune ou inflamatória em animais, verifiquem as condições do biotério que irá fornecer os animais, e que busque preferencialmente os que utilizam barreiras microbiológicas no manejo dos mesmos. Mais do que isso, seria recomendável que biotério pudesse encaminhar, juntamente com os animais solicitados, um relatório que comprovasse o tipo de manejo e os testes sanitários realizados. Indo mais além, consideramos que um esforço organizado e direcionado para a acreditação dos biotérios universitários do país seria de grande interesse, como por exemplo, através da *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care Internacional*

(AAALAC), dentre outras entidades (16), uma vez que se deseja que o Brasil tenha um impacto cada vez mais significativo na pesquisa mundial.

## REFERÊNCIAS

1. Cassel GH, Yancey A. Experimental mycoplasmal respiratory infections in rodents. In: Tully G, Razin S, eds. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Academic Press. San Diego. 1996. v.2, p.327-336.
2. Chambaud I, Heilig R, Ferris S, Barbe V, Samson D, Galisson F, Moszer I, Dybvig K, Wróblewski H, Viari A, Rocha EP, Blanchard A. The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res* 29: 2145-2153, 2001.
3. Cordova CMM. Desenvolvimento de plasmídeos replicativos artificiais para transformação de *Mycoplasma pulmonis*, *M. capricolum* e *M. mycoides subsp. mycoides*, e interrupção do gene da hemolisina A de *M. pulmonis* por recombinação homóloga [Tese de Doutorado em Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP], 2002.
4. Cox NR, Davidson MK, Davis JK, Lindsey JR, Cassell GH. Natural mycoplasmal infections in isolator-maintained LEW/Tru rats. *Lab Anim Sci* 38: 381-388, 1988.
5. Faulkner CB, Simecka JW, Davidson MK, Davis JK, Schoeb TR, Lindsey JR, Everson MP. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, interleukin 6, and gamma interferon in C3H/HeN and C57BL/6N mice in acute *Mycoplasma pulmonis* disease. *Infect Immun* 63: 4084-4090, 1995.
6. Ferreira JB, Yamaguti M, Marques LM, Oliveira RC, Neto RL, Buziniani M, Timenetsky J. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in Laboratory Rats and Technicians. *Zoonoses Public Health* 55: 229-234, 2008.
7. Freund EA. Culture media for classic mycoplasmas. In: Razin S., Tully G., eds. *Methods in mycoplasmaology*. Academic Press. San Diego. 1983. v.1, p.127.
8. Jarach R, Ribeiro-Dias F. Mecanismos patogênicos de micoplasmas que podem desencadear ou exacerbar a artrite reumatóide. *Rev Patol Trop* 33: 149-168, 2004.
9. Kamiyama T, Saito M, Nakagawa M. Effects of *Mycoplasma pulmonis* infection and exposure to nitrogen dioxide on activities of natural killer cells and macrophages of the mouse. *Jikken Dobutsu* 40: 255-257, 1991.
10. Kim D-J, Park J-H, Seok S-H, Cho S-A, Baek M-W, Lee H-Y, Yang K-H, Jang DD, Han B-S, Park J-H. Differential identification of *Mycoplasma pulmonis* and *M. arthritis* using PCR-based RFLP. *Exp Anim* 54: 359-362, 2005.
11. Lambert LC, Trummell HQ, Singh A, Cassell GH, Bridges RJ. *Mycoplasma pulmonis* inhibits electrogenic ion transport across murine tracheal epithelial cell monolayers. *Infect Immun* 66: 272-279, 1998.
12. Liang CT, Shih A, Chang YH, Liu CW, Lee YT, Hsieh WC, Huang YL, Huang WT, Kuang CH, Lee KH, Zhuo YX, Ho SY, Liao SL, Chiu YY, Hsu CN, Liang SC, Yu CK. Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48: 381-386, 2009.
13. Mähler M, Köhl W. A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in western Europe. *Lab Anim* 38: 161-165, 2009.
14. McDonald DM, Schoeb TR, Lindsey JR. *Mycoplasma pulmonis* infections cause long-lasting potentiation of neurogenic inflammation in the respiratory tract of the rat. *J Clin Invest* 87: 787-799, 1991.
15. Norlander T, Nilsson L, Rivero C, Midvedt T, Lidégran M, Carlsoo B, Stierna P. Effects of experimental *Mycoplasma pulmonis* infection on sensory neuropeptides and airway mucosa in the rat. *Eur Respir J* 10: 2334-2342, 1997.
16. Politi FAS, Majerowicz J, Cardoso TAO, Pietro RCLR, Salgado HRN. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 29: 17-28, 2008.

17. Sambrook J, Russel D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. 2001.
18. Silva FMF, Castro LA, Silva Júnior A, Moraes MP, Moreira MAS, Almeida MR. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swabs of pigs by nested PCR/ Detecção de *Mycoplasma hyopneumoniae* em pulmões e suabes nasais de suínos por nested PCR. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61: 149-155, 2009.
19. Schoondermark-van de Ven EM, Philipse-Bergmann IM, van der Logt JT. Prevalence of naturally occurring viral infections, *Mycoplasma pulmonis* and *Clostridium piliforme* in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003. *Lab Anim* 40: 137-143, 2006.
20. Simeka JW, Davis JK, Davidson MK, Ross SE, Stadlander CTK-H, Cassel GH. *Mycoplasma* diseases of animals. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, eds. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. ASM Press. Washington. 1992. v.1, p.391-416.
21. Steffen MJ, Ebersole JL. Secretory immune responses to *Mycoplasma pulmonis*. *Infect Immun* 60: 337-344, 1992.
22. Swing SP, Davis JK, Egan ML. *In vitro* effects of *Mycoplasma pulmonis* on murine natural killer cell activity. *Lab Anim Sci* 45: 352-356, 1995.
23. Timenetsky J, Summa MEL, Lucca RR. *Mycoplasma pulmonis* e/ou *Mycoplasma arthritis* em animais de laboratório (ratos e camundongos) de diferentes biotérios. *Braz J Vet Res Anim Sci* 29: 45-50, 1992.
24. Tully JG, Razin S. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology: diagnostic procedures*. Academic Press. San Diego. 1996. v. 2. p. 327-359.