UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de
***Mycoplasma* spp. em culturas celulares**

Mayra Dorigan de Macedo

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de
***Mycoplasma* spp. em culturas celulares**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Mayra Dorigan de Macedo

**Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima
Haddad**

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Macedo, Mayra Dorigan

Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares. Ribeirão Preto, 2014.

91p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Kashima, Simone.

1. *Mycoplasma*. 2. PCR em tempo real. 3. Cultura celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mayra Dorigan de Macedo

Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Simone Kashima Haddad

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A todos os pacientes que encontram na terapia
celular uma esperança de vida.

E principalmente a todos os doadores de medula
óssea, que em um ato de bondade, doam vida.

Vocês foram o objetivo maior deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pelo dom da vida.

A minha orientadora Prf^a Dr^a Simone Kashima Haddad, pelas oportunidades, por acreditar e confiar em mim, pelos conhecimentos científicos, pelos ensinamentos de conduta na vida profissional e pessoal, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, por viabilizar este projeto e permitir que este sonho se realizasse na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo, em especial a Carmem, por sempre me ajudar com muita disposição e boa vontade.

Ao Laboratório de Cultura Celular, em especial a Prof^a Dr^a Kamilla Swiech, aos colegas Mário, Carol, Ana Júlia, Ângelo e Juliana.

Ao Laboratório de Biotecnologia, em especial as amigas Lilian, Virgínia, Luiza e Marcela pelo companheirismo diário.

Ao Laboratório de Transferência Gênica, meus queridos amigos Lucas, Raquel, Taís, Ricardo e Daiane.

Ao Laboratório de Terapia Celular, em especial a Dr^a Maristela Delgado, por permitir e apoiar este trabalho, pela amizade e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akyra, por sempre me estender a mão.

As queridas amigas “sorolets” do laboratório de sorologia Marisa, Renata, Gisele, Vanderléia, Rita e Aline que tão carinhosamente me recebeu no Hemocentro.

A funcionária e amiga Adriana Marques, pelas conversas agradáveis e pelos sequenciamentos realizados com tanto cuidado e carinho. A querida Anne Marie.

As amigas Rochelle e Evandra, pelos almoços sempre acompanhados de boa conversa e muita terapia.

A todos os funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto que sempre colaboraram para a realização deste trabalho.

As funcionárias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ana Elisa e Vanessa, por permitirem a realização dos experimentos e pelo fornecimento das bactérias.

Aos meus companheiros diários do Laboratório de Biologia Molecular: Lucas, Kátia, Fernanda, Alexander, Svetoslav, Daiane, Maurício, Péricles, Aline Fernanda, Mariana, Suellen, Isabela, Evandra, Tathiane, Talitha e Aline Romagnoli. Agradeço imensamente por tudo. Vocês fazem dos meus dias muito mais alegres.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os meus amigos, que mesmo distantes estão sempre presentes em minha vida.

A minha família, meus tios e primos, por estarem comigo em todos os momentos.

Aos meus pais, José Carlos e Neuza, por serem tudo na minha vida. Devo o que sou a vocês.

Aos meus companheiros de vida e de alma, meus irmãos Rodrigo e Leandro. Sem vocês dois nada teria graça.

Aos meus sogros Vitor e Elisa, e cunhados: Maria do Carmo, Vanessa, Vinícius, Renata e Ellen, por serem sempre tão generosos comigo.

Aos meus pequenos e amados sobrinhos Flávio, Júlia e Gabriela. Vocês são presentes de Deus em minha vida.

Ao meu amigo e companheiro de todas as horas, meu marido Vitor. Obrigada por estar em minha vida.

RESUMO

MACEDO, M. D. **Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares.** 2014. 91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O cultivo de células humanas para fins experimentais e terapêuticos se firmou como um dos pilares da biologia celular e tem se tornado uma prática laboratorial cada vez mais disseminada. Associada a esse processo está a contaminação por microrganismos, dentre os quais se destacam as bactérias do gênero *Mycoplasma* spp., os quais são os contaminantes detectados com maior frequência *in vitro*. Um dos pontos críticos no processo de garantia da qualidade, pureza e segurança para uso destas células é a adoção de uma metodologia analítica, para detecção de *Mycoplasma* spp., que seja simples e de rápida execução, com sensibilidade e especificidade adequada e economicamente viável. O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma plataforma molecular (PCR em tempo real) para detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares. Para tanto, foram testados diversos conjuntos de *primers* (gene 16S rDNA) dentre os quais um foi selecionado para a plataforma molecular. Foram utilizadas amostras de DNA obtidas a partir do sobrenadante de cultura. A PCR em tempo real *in house* foi padronizada utilizando o intercalante fluorescente de DNA dupla fita *BRYT Green*[®] e produziu um fragmento de 270 pares de bases. A temperatura de *melting* para as amostras positivas foi definida no intervalo de 81 a 84°C. A plataforma molecular foi validada por meio dos parâmetros sensibilidade analítica e diagnóstica, especificidade analítica, potencial de arraste, precisão e robustez. O limite de detecção do teste (LOD) foi de 5 cópias/5 µL. Para a especificidade, foi observada reação cruzada com bactérias de relação filogenética próxima e com DNA de célula humana. A sensibilidade diagnóstica foi de 100%. Não houve contaminação por arraste. O coeficiente de variação encontrado no parâmetro precisão foi de 0,64% e 1,80% para a avaliação intra-ensaio e inter-ensaio, respectivamente. O coeficiente de variação da análise robustez foi de 5,42%. Ao comparar a plataforma molecular com o teste comercial, observou-se que 29,85% (n=40) das amostras apresentaram resultados falso-negativos pelo teste comercial. Determinou-se ainda que a PCR em tempo real *in house* foi mais sensível do que o teste comercial. A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou a presença de estruturas sugestivas de espécies de *Mycoplasma* spp. na superfície das células. A análise filogenética permitiu a classificação das espécies encontradas. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram propor o algoritmo para aplicação de um método de detecção simples e rápido para *Mycoplasma* spp.; e fazer deste uma ferramenta para o controle de qualidade das células cultivadas, garantindo a eficiência destas células para uso em pesquisa e maior segurança para uso em terapia celular.

Palavras-Chave: *Mycoplasma* spp., PCR em tempo real, Cultura Celular.

ABSTRACT

MACEDO, M. D. **Development of a platform for molecular detection of *Mycoplasma* spp. in Cell Cultures.** 2014. 91f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The culture of human cells for experimental and therapeutic purposes has been consolidated as one of the foundations of cell biology and has increasingly become a widely used laboratory practice. The contamination by microorganisms is associated with this process, among them we can highlight bacteria of the genus *Mycoplasma* spp., which are contaminants more frequently detected *in vitro*. One of the critical points in the process of assuring quality, purity, and safety for the use of these cells is the adoption of an analytical methodology for the detection of mycoplasma that is simple and fast to conduct, with proper sensitivity and specificity and that is also economically viable. The objective of this work was to develop a molecular platform (real time PCR) for the detection of mycoplasmas in cell cultures. Therefore, we tested several sets of primers (16S rDNA gene), among them one was selected for the molecular platform. DNA samples used were obtained from the culture supernatant. *In house* real time PCR was standardized using *BRYT Green*[®] double-stranded DNA intercalating fluorescent and produced a fragment of 270 pair bases. The melting temperature for the positive samples was set in the range 81 to 84°C. The molecular platform was validated through the parameters: analytical and diagnostic sensitivity, analytical specificity, carry-over contamination, precision and robustness. The limit of detection of the test (LOD) was 5 copies/5 µL. For specificity, it was observed a cross reaction with bacteria of close phylogenetic relationship and with human cell DNA. Diagnostic sensitivity was 100%. There was no carry-over contamination. The coefficient of variation was found in the precision values of 0.64% and 1.80% for intra-assay and inter-assay assessment, respectively. The variance coefficient of the robustness analysis was 5.42%. By comparing the molecular platform with the commercial test, we observed that 29.85% (n=40) of the samples showed false negative results by the commercial test. It has been determined further that the real-time PCR *in house* was more sensitive than the commercial test. The analysis by scanning electron microscopy demonstrated the presence of suggestive structures of *Mycoplasma* spp. species in the surface of cells. Phylogenetic analysis allowed the classification of the species found. The results obtained in this work allowed us to propose the algorithm for application of a simple and fast method for mycoplasma detection and making from this tool for quality control for cultured cells, assuring the efficiency of these cells for use in research and greater safety for use in cell therapy more safety to patients subjected to cell therapy.

Keywords: Mycoplasma, Real time PCR, Cell Culture.

RESUMEN

MACEDO, M. D. **Desarrollo de una plataforma para la detección molecular de *Mycoplasma* spp. en cultivos de células.** 2014. 91f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

El cultivo de células humanas para fines experimentales y terapéuticos se estableció como uno de los pilares de la biología celular y se ha tornado una práctica laboratorial cada vez más diseminada. Asociado a ese proceso está la contaminación por microorganismos, entre los cuales se destacan las bacterias del género *Mycoplasma* spp., las cuales son los contaminantes detectados con mayor frecuencia *in vitro*. Uno de los puntos críticos en el proceso de garantía de la calidad, pureza y seguridad para uso de estas células es la adopción de una metodología analítica, para detección de *Mycoplasma* spp., que sea simple y de rápida ejecución, con sensibilidad y especificidad adecuada y económicamente viable. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una plataforma molecular (PCR en tiempo real) para detección de *Mycoplasma* spp. en cultivos celulares. Para tal fin, fueron testados varios conjuntos de *primers* (gene 16S rDNA) entre los cuales uno fue seleccionado para la plataforma molecular. Muestras de DNA usados se obtuvieron a partir del sobrenadante de cultivo. La PCR en tiempo real *in house* fue padronizada utilizando el intercalante fluorescente de DNA doble cadena *BRYT Green*[®] produciendo un fragmento de 270 pares de bases. La temperatura de *melting* de las muestras positivas se encuentra en el rango de 81 a 84 ° C. La plataforma molecular fue validada por medio de los parámetros sensibilidad analítica y diagnóstica, especificidad analítica, potencial de arraste, precisión y robustez. El límite de detección del test (LOD) fue de 5 copias/5 µL. Para la especificidad, fue observada reacción cruzada con bacterias de relación filogenética próxima y con DNA de célula humana. La sensibilidad diagnóstica fue de 100%. No hubo contaminación por arraste. El coeficiente de variación fue encontrado en los valores de precisión de 0,64% y 1,80% para intra-ensayo y inter-ensayo, respectivamente. El coeficiente de variación del análisis robustez fue de 5,42%. Al comparar la plataforma molecular con el test comercial, se observó que 29,85% (n=40) de las muestras presentaron resultados falso negativos por el test comercial. Se ha determinado además que la PCR en tiempo real *in house* era más sensible que la prueba comercial. El análisis por microscopía electrónica de barrido demostró la presencia de estructuras sugestivas de especies de *Mycoplasma* spp. en la superficie de las células. El análisis filogenético permitió la clasificación de las especies encontradas. Los resultados de este estudio indican que el algoritmo propuesto para la aplicación de un método sencillo y rápido para la detección de *Mycoplasma* spp.; y hacer de esta una herramienta para el control de calidad de las células en cultivo, lo que garantiza la eficacia de estas células para su uso en la investigación y una mayor seguridad para su uso en terapia celular.

Palabras Clave: *Mycoplasma*, PCR en tiempo real, Cultivo Celular.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da estratégia experimental para o desenvolvimento da plataforma molecular	19
Figura 2. Representação esquemática do vetor de sequenciamento pCR® 2.1-TOPO.....	23
Figura 3. Representação esquemática do sítio de clonagem do vetor pCR® 2.1-TOPO	26
Figura 4. Alinhamento múltiplo das regiões dos <i>primers forward 4/reverse 2</i> e as sequências de referência obtidas do <i>GenBank</i>	35
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado pela PCR convencional <i>in house</i> realizada com os <i>primers forward 4 e reverse 2</i>	36
Figura 6. PCR em tempo real <i>in house</i> com os <i>primers</i> selecionados <i>forward 4 / reverse 2</i>	37
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para caracterização do controle positivo.....	38
Figura 8. Eletroferograma parcial obtido do sequenciamento do controle positivo.....	38
Figura 9. Alinhamento da sequência do 16S rDNA do controle positivo e DNA genômico com a sequência de referência	39
Figura 10. Teste de sensibilidade analítica realizado para a PCR convencional <i>in house</i>	41
Figura 11. Sensibilidade analítica realizado para a PCR em tempo real <i>in house</i>	41
Figura 12. Curvas de Regressão Linear e o número de cópias presente em cada ponto da curva de sensibilidade das amostras ONS-76, HEK 293 e SK-HEP-1.	46
Figura 13. Microscopia Eletrônica de Varredura	48
Figura 14. Eletrônica de Varredura Comparativa entre MSC-MO e HEK 293	48
Figura 15. Árvore filogenética evidenciando a separação do <i>outgroup</i> e a formação dos clusters	50
Figura 16. Algoritmo estabelecido para aplicação da plataforma molecular na rotina dos laboratórios de cultura de células	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais métodos utilizados para detecção de <i>Mycoplasma</i> spp.....	9
Tabela 2. Descrição dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR	20
Tabela 3. Descrição do tamanho do produto amplificado de acordo com o conjunto de <i>primers</i>	21
Tabela 4. Sensibilidade analítica para os métodos de detecção de <i>Mycoplasma</i> ssp. por PCR convencional e a PCR em tempo real <i>in house</i>	40
Tabela 5. Amostras constituintes do teste de especificidade analítica	42
Tabela 6. Valores de Ct obtidos na avaliação da precisão da PCR em tempo real <i>in house</i> ...	43
Tabela 7. Valores de Ct obtidos na avaliação da robustez da PCR em tempo real <i>in house</i> ...	44
Tabela 8. Agrupamento dos resultados obtidos pelos dois métodos evidenciando a concordância e discordância entre os mesmos	44
Tabela 9. Curva de sensibilidade com as amostras ONS-76, HEK 293 e SK-HEP-1 pelos testes <i>MycoAlert</i> [®] e plataforma molecular	45
Tabela 10. Caracterização das amostras utilizadas para a microscopia eletrônica de varredura.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16s rDNA	= gene codificante da subunidade 16 S ribossomal
BLAST	= <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CFU	= unidades formadores de colônias (do inglês, <i>colonyformingunit</i>)
CIBio	= Comissão Interna de Biossegurança
Ct	= ciclo de amplificação (do inglês, <i>cyclethreshold</i>)
CTC	= Centros de Tecnologia Celular
CTM	= célula-tronco mesenquimal
DNA	= ácido desoxirribonucleico
dNTPs	= desoxirribonucleotídeos trifosfatados
ELISA	= ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay</i>)
FDA	= <i>Food and Drug Administration</i>
GC	= guanina e citosina
GVHD	= doença do enxerto versus o hospedeiro (do inglês, <i>graft-versus-host-disease</i>)
HIV	= vírus da imunodeficiência humana
ICSP	= <i>International Committee on Systematics of Prokaryotes</i>
kb	= quilobases
LB	= <i>Luria-Bertani</i>
LOD	= limite de detecção (do inglês, <i>limitof detection</i>)
MEV	= Microscopia Eletrônica de Varredura
MSC-MO	= célula-tronco mesenquimal – medula óssea
MSC-TA	= célula-tronco mesenquimal – tecido adiposo
NAT	= Teste de ácidos nucleicos (do inglês, <i>NucleicAcidTesting</i>)
nº	= número
NTC	= no template control
pb	= pares de base
PBS	= tampão fosfato tamponado com salina
PCR	= reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PPLO	= <i>pleuropneumonia-like organisms</i>
PTP	= <i>Permutation Tail Probability</i>
RDC	= Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	= ácido ribonucleico
Tm	= temperatura de <i>melting</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Panorama Atual da Aplicação do Cultivo de Células.....	2
1.2 Terapia Celular	2
1.3 <i>Mycoplasmas</i> spp.: contaminantes em culturas celulares.....	4
1.3.1 Características Gerais dos <i>Mycoplasma</i> spp.....	4
1.3.2 <i>Mycoplasma</i> spp. nas Culturas Celulares	6
1.4 Métodos de Detecção para <i>Mycoplasma</i> spp.....	8
1.5 Teste Molecular para <i>Mycoplasma</i> spp.	10
1.5.1 Gene alvo 16S rDNA e desenho de <i>primers</i>	11
1.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	12
1.5.3 Validação da Metodologia.....	13
1.5.4 Justificativa do Estudo.....	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Aspectos Éticos	19
3.2 Desenho dos <i>Primers</i>	19
3.3 Otimização da PCR Convencional <i>in house</i>	21
3.4 Construção do Controle Positivo.....	22
3.4.1 Reação de Amplificação do Fragmento e Ligação no Vetor pCR2.1-TOPO.....	22
3.4.2 Transformação de Bactérias Competentes	23
3.4.3 Expansão dos Clones em Meio Líquido	24

3.4.4 Obtenção do DNA Plasmidial	24
3.4.5 Amplificação do DNA Plasmidial e DNA Genômico por PCR.....	24
3.4.6 Sequenciamento do Produto Amplificado do DNA Plasmidial e DNA Genômico	25
3.4.7 Linearização do DNA Plasmidial com Enzima de Restrição	26
3.5 Otimização da PCR em Tempo Real.....	26
3.6 Amostras e Processamento	27
3.6.1 Amostras.....	27
3.6.2 Controle Negativo	27
3.6.3 Processamento das Amostras.....	27
3.7 Validação do Método.....	27
3.7.1 Sensibilidade Analítica	28
3.7.1.1 Construção da Curva de Calibração	28
3.7.1.2 Teste de Sensibilidade Analítica.....	28
3.7.2 Especificidade Analítica	29
3.7.3 Sensibilidade Diagnóstica.....	29
3.7.4 Potencial de Arraste.....	30
3.7.5 Precisão.....	30
3.7.6 Robustez	30
3.8 Teste Comercial para detecção de <i>Mycoplasma</i> spp.	30
3.8.1 Comparação da Plataforma Molecular <i>in house</i> com o Teste Comercial.....	31
3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
3.10 Análise filogenética	32
4 RESULTADOS	35
4.1 Seleção de <i>Primers</i>	35
4.2 Otimização da PCR Convencional e em Tempo Real <i>in house</i>	36
4.3 Construção do Controle Positivo.....	37
4.4 Validação do Método.....	40
4.4.1 Sensibilidade Analítica	40
4.4.2 Especificidade Analítica	41
4.4.3 Sensibilidade Diagnóstica.....	43
4.4.4 Potencial de Arraste.....	43
4.4.5 Precisão.....	43
4.4.6 Robustez	44
4.5 Plataforma Molecular <i>in house</i> e Teste Comercial <i>MycoAlert</i> ®	44

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
4.7 Análise Filogenética	45
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES.....	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
APÊNDICES	45
Apêndice I – Descrição detalhada dos resultados obtidos para o teste de especificidade analítica realizado com DNA de bactérias de relação filogenética próxima as bactérias alvo. Valores aproximados para o Ct (<i>cycle threshold</i>).....	45
Apêndice II – Descrição detalhada dos resultados obtidos para o teste de especificidade analítica com DNA de célula eucariótica. Valores aproximados para o Ct (<i>cycle threshold</i>).....	45
Apêndice III – Descrição detalhada dos resultados obtidos pelo teste comercial <i>MycoAlert</i> ® e pela plataforma molecular <i>in house</i> a partir de sobrenadante. Análise comparativa dos resultados quanto à positividade. Valores aproximados para o Ct (<i>cycle threshold</i>).....	45
Apêndice IV – Número de acesso no <i>GenBank</i> das espécies utilizadas na construção da árvore filogenética.	45
ANEXOS	45
Anexo I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 3.500/2013, referente à utilização do sobrenadante de culturas de células humanas.	45
Anexo II – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 12.602/2013, referente à utilização de células humanas cultivadas.	45
Anexo III – Aprovação da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Processo nº 297/2012.008-01.....	45

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama Atual da Aplicação do Cultivo de Células

O cultivo de células na pesquisa científica é uma tecnologia amplamente empregada para elucidar desde os mecanismos básicos da célula até processos mais complexos como sinalização, funcionamento e comportamento de tecidos humano, animal ou vegetal. Com o passar do tempo, aliada à evolução da engenharia celular e genética, esta ferramenta deixou de se limitar a fins experimentais e ampliou as perspectivas para o seu uso, possibilitando o escalonamento do cultivo de diversos tipos celulares com fins biotecnológicos e farmacêuticos (ARATHOON; BIRCH, 1986). As empresas deste setor investem na produção de biofármacos e bioderivados, como proteínas recombinantes (eritropoietina humana, fator VIII da cascata de coagulação), anticorpos monoclonais para imunoenaios e vacinas. Paralelamente, as células cultivadas também passaram a ser alvo da medicina regenerativa, que vem despontando como uma modalidade terapêutica e promissora. O cultivo celular se estabeleceu como ferramenta para obtenção de células para tratamento e reconstrução de tecidos lesados. Deste modo, o cultivo de células se firmou como um dos pilares para a biologia celular e molecular, fazendo desta, uma prática laboratorial disseminada e rotineira.

1.2 Terapia Celular

A terapia celular consiste na substituição de células não funcionais por células saudáveis, objetivando tratar uma variedade de doenças degenerativas para as quais não há tratamentos específicos e efetivos. A capacidade de auto-renovação por meio de divisão assimétrica, de diferenciação em múltiplas linhagens celulares e de proporcionar a reconstituição, *in vivo*, de tecidos lesados fez com que o uso de células-tronco se firmasse como um dos métodos mais bem estabelecidos nessa linha terapêutica (Verfaillie, 2002). Apesar de as células-tronco mesenquimais (CTM) não apresentarem todas as propriedades de células-tronco, elas também tem sido exploradas para esse fim, por serem multipotentes e capazes de se diferenciar em várias outras células quando sob condições específicas (PITTENGER et al., 1999; CAPLAN; BRUDER, 2001; YOUNG; BLACK Jr., 2004; LE BLANC; PITTENGER, 2005).

O isolamento das células-tronco mesenquimais de medula óssea frequentemente é realizado por meio da capacidade que estas células possuem de se aderir ao plástico (FRIEDENSTEIN; GORSKAJA; KULAGINA, 1976). Inicialmente, uma punção da medula é

realizada para obtenção da amostra. Após o processamento deste material por meio de um gradiente de centrifugação, as células com menor densidade são coletadas e plaqueadas em recipientes e meios apropriados. Posteriormente à adesão celular, as células não-aderentes são removidas no momento da troca do meio de cultivo, permanecendo as células de interesse, neste caso as CTM. Estas células apresentam morfologia fibroblastóide alongada, fusiforme, pontiaguda, com núcleo eucromático, oval, grande e central, e com citoplasma abundante (TAGAMI et al., 2003).

Na terapia celular, as células-tronco mesenquimais podem ser transplantadas tanto por infusão local no alvo como por infusão sistêmica. Por meio de infusão local as CTM promovem um reparo no tecido lesado. Já as células infundidas por via endovenosa migram especificamente para o sítio de lesão (BARRY; MURPHY, 2004) e desempenham um papel ativo no reparo tissular (MINGUELL; CONGET; ERICES, 2000). Contudo, a capacidade migratória é diminuída no decorrer de seu cultivo *ex vivo*, o que influencia negativamente o uso terapêutico destas células (BARRY; MURPHY, 2004).

Uma das principais linhas de estudos sobre as CTM é a capacidade imunorregulatória destas células. Estudos pré-clínicos e clínicos evidenciam o efeito imunorregulador destas células em protocolos para controle da doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD – do inglês, *graft-versus-host-disease*); lúpus eritematoso sistêmico; esclerose múltipla e diabetes tipo 1 (FIORINA; VOLTARELLI; ZAVAZAVA, 2011). Apesar dos mecanismos moleculares envolvidos na atividade imunossupressoras das CTM não estarem elucidados por completo, sabe-se que a interação CTM-linfócitos é responsável pelos efeitos imunológicos destas células.

O preparo de amostras para o uso na terapia celular envolve a manipulação humana das células, desde o momento da coleta até a infusão das mesmas no paciente. A obtenção do número adequado de células para a infusão (2×10^6 células/kg de massa corporal do paciente) só é possível após a realização de vários repiques (passagens). Essa manipulação intensa das células é realizada em sistema aberto, o que aumenta o risco de contaminação do produto, mesmo que sejam respeitadas as boas práticas recomendadas para acultura celular.

Um produto celular expandido *ex vivo* deve ter qualidade e segurança para ser transplantado. A contaminação bacteriana é um dos principais riscos associados com transfusão de produtos sanguíneos e causa severas infecções relacionadas ao transplante (RIBAUT et al., 2005). A infusão de um produto celular contaminado pode comprometer a resposta terapêutica, aumentar os custos hospitalares, a comorbidade e mortalidade associadas à terapia empregada. O sistema de hemovigilância francês identificou que entre 1994 e 1998,

22% dos casos fatais pós-transplantes estavam associados com contaminação bacteriana do produto transplantado (ANDREU et al., 2002). Assim, implementar um controle para aumentar a qualidade e segurança no uso das células é fundamental, uma vez que este tipo de tratamento é frequentemente realizado em pacientes debilitados e imunossuprimidos.

1.3 *Mycoplasmas* spp.: contaminantes em culturas celulares

A expansão de células *ex vivo* por um longo período aumenta o risco de contaminações por agentes microbianos que afetam a qualidade e segurança do produto (GUO et al., 2011). Qualquer descuido durante a manipulação pode resultar em contaminação das células (GOLDMAN; SHER; BLAJCHMAN, 2000), isso porque o cultivo é realizado em sistema aberto e os meios de cultura são extremamente ricos em nutrientes. Os microrganismos contaminantes mais frequentemente encontrados são as bactérias e fungos, que em geral, estes apresentam uma elevada taxa de crescimento, o que permite rápida identificação da contaminação. Contudo, a presença de alguns contaminantes, como os *Mycoplasma* spp., passa despercebida devido ao pequeno tamanho, o que dificulta a sua visualização no microscópio óptico e contribui para a não detecção da contaminação. Além disso, o uso contínuo de antibióticos durante o cultivo mantém os microrganismos em níveis basais, estabelecendo contaminações crônicas e cepas resistentes.

1.3.1 Características Gerais dos *Mycoplasma* spp.

O primeiro relato de detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas de células foi apresentado em 1956 por Robinson e colaboradores, quando estes microrganismos ainda eram nomeados como *Pleuropneumonia-like organisms* (PPLo). Esses microrganismos são filogeneticamente originários de bactérias Gram-positivas. No entanto, apresentam como característica a perda da parede celular rígida, o que contribui para a ineficácia de antibióticos que atuam sobre esta estrutura ou na sua síntese. Em função dessas diferenças e para que elas pudessem ser agrupadas com os demais procariontes, foi criada a classe *Mollicutes*. O gênero *Mycoplasma* corresponde a um dos quatorze gêneros com maior número de espécies dessa nova classe. No entanto, as nomenclaturas *Mycoplasma* e *Mollicutes* são utilizadas trivialmente como sinônimos.

Os *Mycoplasma* spp. são considerados os menores organismos (0,2 a 0,8 µm de diâmetro) de vida livre, com capacidade de se auto-replicar em meio de cultura, independente de célula.

Apesar de serem de vida livre, a maioria das espécies habita mucosa respiratória e urogenital devido à facilidade para obter nutrientes. Quando presentes, o seu tamanho reduzido e a sua flexibilidade, devido à ausência de parede celular, contribuem respectivamente para a não turvação dos meios de culturas e por passarem através de filtros bacteriológicos (0,45 µm de diâmetro). Envolto somente por uma membrana celular, composta basicamente por colesterol e proteínas, apresenta principalmente morfologia esférica, podendo também ser observadas células em forma de pêra, de filamentos helicoidais e filamentos com diversos tamanhos (RAZIN; YOGEN; NAOT, 1998). A manutenção destas formas na ausência de uma parede celular rígida evidencia a presença de um citoesqueleto (RAZIN, 1978).

Este microrganismo se multiplica por divisão binária, mas sem sincronia entre replicação do genoma e divisão do citoplasma. Isto significa que pode ocorrer replicação do DNA mais rápida do que a divisão citoplasmática, resultando na formação de filamentos multinucleados (RAZIN, 1978). Ao contrário de outras bactérias, os *Mycoplasma* spp. crescem muito lentamente, mesmo sob condições apropriadas. O tempo de geração de uma célula geralmente é de uma a três horas, podendo alcançar até nove horas (DREXLER; UPHOFF, 2002). Isso implica no longo tempo necessário para a realização do teste microbiológico (padrão ouro), no qual o tempo para visualização de colônias em ágar pode chegar até 28 dias (VOLOKHOV; GRAHAM; BRORSON; CHIZHIKOV, 2011).

Assim, um dos principais obstáculos para a pesquisa e o diagnóstico laboratorial de infecções é o cultivo *in vitro* dos *Mycoplasma* spp.. Somente uma minoria das espécies existentes na natureza foi cultivada até o momento. Algumas espécies são de difícil cultivo mesmo nos mais adequados meios disponíveis (RAZIN, 1994). A ausência de genes envolvidos em vias de biossíntese foi demonstrada por Fraser et al. (1995) e Himmelreich et al. (1996) para as espécies *M. genitalium* e *M. pneumoniae*, o que faz destes microrganismos dependentes de aminoácidos exógenos e explica a dificuldade de cultivo.

Outra característica importante é que estes mollicutes apresentam genoma pequeno (580 kb a 1380 kb), com baixo conteúdo GC, e poucos mecanismos de reparo de DNA, o que possibilita a ocorrência de mutações e variações antigênicas e, conseqüentemente a geração de cepas resistentes a antibióticos. Medvedeva et al. (2014) descreveram em *Acholeplasma laidlawii* o transporte do antibiótico (ciprofloxacina) para fora do núcleo promovido por vesículas extracelular, bem como o surgimento de uma mutação no gene alvo. Além da capacidade de adaptação aos agentes microbianos, os *Mycoplasmas* spp. possuem mecanismos de modulação e evasão a resposta imunológica do hospedeiro, realizam trocas antigênicas com as células parasitadas e invadem as mesmas podendo causar apoptose celular.

Estes microrganismos, os quais são capazes de estabelecer infecções latentes e crônicas, podem se comportar como bactérias oportunistas. *M. fermentans* (BOLSKE, 1988) foi descrito como um co-fator no HIV e *M. pirum*, uma espécie inicialmente detectada apenas em culturas de células, foi isolado de sangue de pacientes com HIV (GRAU; KOVACIC; GRIFFAIS; MONTAGNIER, 1993).

As espécies de *Mycoplasma* spp. estão amplamente distribuídos na natureza como parasitas de humanos, mamíferos, aves, répteis, peixes, artrópodes e plantas (RAZIN, 1992). Os principais habitats nos humanos e animais são as superfícies mucosas do trato respiratório e urogenital, olhos, tubo digestivo, glândulas mamárias e articulações. Geralmente exibem especificidade de tecido e hospedeiro, mas há inúmeros exemplos da presença de *Mycoplasma* spp. em hospedeiros e tecidos diferentes de seus habitats normais (RAZIN, 1992). Apesar de convencionalmente o *M. pneumoniae* ser encontrado preferencialmente no trato respiratório e o *M. genitalium* no trato urogenital, Goulet et al. (1995) isolou *M. pneumoniae* a partir do trato urogenital humano. Além disso, acreditava-se que a localização de *Mycoplasma* spp. em células eucarióticas fosse somente à superfície extracelular aderidos à membrana por citoaderência. Contudo, estudos recentes demonstraram a localização intracelular de algumas espécies (*M. fermentans*, *M. genitalium* e *M. pneumoniae*) não apenas após a fagocitose por granulócitos e monócitos, mas também em células epiteliais não fagocíticas. Lo et al. (1992) descreveram uma nova espécie do gênero *Mycoplasma* (*M. penetrans*), capaz de penetrar em uma variedade de células humanas *in vivo* e *in vitro*. Assim, a localização intracelular, mesmo que por um curto período, sequestra os *Mycoplasma* spp. e pode proteger-los efetivamente das terapias micoplasmicidas.

1.3.2 *Mycoplasma* spp. nas Culturas Celulares

Desde que as ocorrências de contaminações bacterianas e fúngicas foram minimizadas com a introdução de antibióticos nos meios de cultivo de células, o *Mycoplasma* spp. passou a ser o contaminante mais frequentemente detectado em células de mamíferos cultivadas *in vitro* (MIYAKI; PRAL; GALLINA; RIZZO, 1989). A vasta literatura sobre o assunto reflete os graves problemas criados pela persistente contaminação das culturas. Relatórios de vários países mostram que 10 a 87% de culturas de células são infectados por *Mycoplasmas* (BARILE; ROTTEM, 1993; BOLSKE, 1988; MCGARRITY; KOTANI; BUTLER, 1992). Drexler et al. (2002) relataram que de 440 amostras de linhagens celulares de linfoma, apenas 64% foram identificadas como negativas para a presença de *Mycoplasma*. As espécies mais

frequentes permaneceram essencialmente as mesmas ao longo dos anos, com destaque para *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, e *A. laidlawii*. Culturas de células primárias e com poucas passagens têm sido descritas com menor incidência de contaminação quando comparadas com linhagens e células com mais passagens. Uma célula de *Mycoplasma* spp. em uma cultura infectada pode produzir 10^6 unidades formadoras de colônia por mL em três a cinco dias. Uma cultura infectada apresenta em média de 10^6 a 10^8 organismos por mL. Assim, é estimado que haja de 100 a 1000 *Mycoplasmas* aderidos em cada célula de uma cultura infectada (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Diversas podem ser as fontes de origem das contaminações em células de cultura. Aparentemente, os tecidos usados para iniciar a cultura celular não representam a principal fonte de contaminação, uma vez que a frequência de contaminação em culturas de células primárias descrita na literatura é de 1% (BARILE; ROTTEM, 1993; MCGARRITY; VANAMAN; SARAMA, 1985). Há algumas décadas, a principal fonte desse tipo de contaminação era o soro fetal bovino (25-40% dos lotes de soro contaminados) utilizado (BARILE; ROTTEM, 1993). Esta contaminação diminuiu significativamente nos últimos anos devido aos esforços dos fabricantes em relação à prevenção e ao controle de qualidade (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Como a maior porcentagem dos *Mycoplasma* spp. encontrados em cultura celular é de origem humana e as espécies são sempre as mesmas, supõe-se que a principal fonte de contaminação seja o próprio homem (MCGARRITY; KOTANI; BUTLER, 1992), uma vez que espécies não patogênicas (para pessoas imunocompetentes) fazem parte da flora microbiana humana. Além disso, linhagens celulares contaminadas por *Mycoplasma* spp. são importantes fontes de difusão da contaminação, uma vez que aerossóis são formados com facilidade durante a manipulação das células; que há uma alta concentração de *Mycoplasma* spp. em culturas contaminadas e que os mesmos apresentam sobrevivência prolongada mesmo em superfícies secas (DREXLER; UPHOFF, 2002).

A contaminação por *Mycoplasma* spp. pode ter inúmeros efeitos sobre as células contaminadas. Diferenças qualitativas e quantitativas em um mesmo parâmetro podem ocorrer dependendo da espécie infectante, das condições de cultura, do tipo de célula infectada, da intensidade e da duração da infecção. Alguns dos mais importantes efeitos que uma contaminação por *Mycoplasma* spp. pode causar nas células são: alteração na composição celular (antígeno de superfície e expressão do receptor); alteração nos níveis de proteínas, RNA e síntese de DNA; alteração da morfologia celular; alteração do metabolismo celular; indução de aberrações cromossômicas (alterações numéricas e estruturais); indução ou

supressão de expressão de citocinas; aumento ou redução de propagação de vírus; indução ou inibição de ativação de linfócitos; influência sobre o sinal de transdução; interferência com ensaios bioquímicos e biológicos; promoção de transformação celular; alteração das características de proliferação (viabilidade, crescimento) e total degeneração da cultura (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Desde que a contaminação por *Mycoplasma* spp. em culturas de células foi relatada pela primeira vez, teve início uma busca por métodos para eliminar este agente contaminante. Para evitar problemas futuros de disseminação da contaminação, as culturas comprometidas devem preferencialmente ser descartadas e autoclavadas (HAY; MACY; CHEN, 1989). Dessa forma, a tentativa de recuperar o material por meio da eliminação da contaminação deve ser realizada como um último recurso, nos casos específicos em que os riscos do método justifiquem o benefício da técnica empregada.

O uso de antibióticos em se firmado como o principal método para esse fim. No entanto, a falta de parede celular e a incapacidade de sintetizar peptidoglicanos apresentados pelos *Mycoplasmas* spp. parecem ser fatores fundamentais para a pouca efetividade desse tipo de tratamento, já que estão relacionados com a baixa sensibilidade desses microrganismos aos produtos disponíveis no mercado. Aqueles medicamentos que se mostram eficazes na erradicação do contaminante, geralmente precisam ser utilizados em altas concentrações, essa condição traz efeitos prejudiciais sobre as células e pode gerar cepas resistentes. Além disso, alguns antibióticos apenas inibem o seu crescimento, mas não o eliminam, mascarando a sua presença. Assim, as condições do tratamento antimicoplasma disponíveis na atualidade tem se mostrado estressantes para as células, que podem deixar de apresentar as propriedades desejadas (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Como em qualquer tipo de contaminação, seja em humanos ou culturas celulares, a prevenção é a medida que deve ser priorizada. As boas práticas de culturas de células devem ser estabelecidas por meio de *facility* (infra-estrutura adequada), procedimento operacional (testes de rotina para contaminação microbiana) e operador capacitado. A obtenção de células cultivadas livres de *Mycoplasma* spp. é relevante para as pesquisas experimentais, mas tem importância primordial na obtenção de células funcionais e seguras para o uso em terapias celulares.

1.4 Métodos de Detecção para *Mycoplasma* spp.

Ao longo dos anos, várias técnicas têm sido desenvolvidas a fim de identificar a presença de *Mycoplasma* spp. nas culturas celulares. A maioria dos métodos demanda tempo

relativamente longo, envolve avaliações subjetivas e usa medidas complexas (DREXLER; UPHOFF, 2002). Os métodos de detecção são divididos em direto e indireto (VOLOKHOV et al., 2011). Enquanto o método direto consiste na detecção do microrganismo, a detecção indireta inclui procedimentos que medem um produto de um gene associado ao *Mycoplasma* spp.. Um método de detecção ideal deve ser sensível (detecção de verdadeiros positivos), específico (detecção de verdadeiros negativos), preciso, com valor preditivo alto (probabilidade de resultado correto), reprodutível, além de simples, rápido, eficiente e com custo-benefício viável. Há vários métodos de detecção utilizados, porém os mesmos apresentam baixa sensibilidade, detecção de um número restrito de espécies, são de difícil interpretação, apresentam técnicas longas além do alto custo. Na tabela 1, encontram-se os principais métodos de detecção utilizados com suas respectivas sensibilidades e as principais vantagens e desvantagens de cada método.

Tabela 1 – Principais métodos utilizados para detecção de *Mycoplasma* spp..

MÉTODO	SENSIBILIDADE	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Coloração Direta do DNA	Baixa	Rápido, Barato	Pode ser de difícil interpretação.
Coloração Indireta do DNA	Alta	Fácil de interpretar por causa da amplificação do contaminante.	Indireta, por isso mais demorada.
Cultura Microbiológica	Alta	Sensível	Demorado (28 dias) e requer interpretação especializada.
PCR	Alta	Rápido	Requer otimização.
Nested PCR	Alta	Rápido	Mais sensível que PCR, porém com mais resultado falso-positivo.
ELISA	Moderada	Rápido	Detecção limitada das espécies.
Autoradiografia	Moderada	Rápido	Pode ser difícil interpretar quando há baixo nível de contaminantes.
Marcação Imunológica	Moderada	Rápido	Pode ser difícil interpretar quando há baixo nível de contaminantes.

Abreviaturas: PCR: reação em cadeia da polimerase, ELISA: ensaio imunoenzimático.
Adaptado de Young et al. (2010).

Dentre os métodos indiretos, destacam-se a reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*, PCR) que consiste na detecção de produtos de DNA (*amplicons*) obtidos após a reação de amplificação; os testes imunológicos (sorológicos) e os testes bioquímicos. Entretanto, os testes imunológicos são destinados ao diagnóstico da infecção em humanos e animais e, portanto, possuem aplicação limitada na detecção em cultura celular devido à falta de anticorpos comerciais capazes de reconhecer diferentes espécies. Já os testes bioquímicos (*MycoAlert*[®]), que avaliam a atividade de enzimas específicas de *Mycoplasma* spp., não identificam a espécie do agente contaminante. Além disso, a enzima-alvo deve estar presente em quantidades significativas e ter meia-vida longa para uma sensibilidade adequada (UPHOFF; GIGNAC; DREXLER, 1992).

1.5 Teste Molecular para *Mycoplasma* spp.

Os testes moleculares têm-se mostrado como uma ferramenta poderosa para a detecção de agentes infecciosos, principalmente aqueles de difícil cultivo. Com a expansão do uso desta metodologia pelos laboratórios clínicos, surgiu a necessidade de incluir ensaios qualitativos e quantitativos para verificar e validar o método, o que gerou a aprovação de alguns testes moleculares pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Um dos principais objetivos das agências regulatórias é garantir a precisão, confiabilidade e adequação dos resultados produzidos pelos testes diagnósticos. Para isto, estas agências definem os padrões mínimos que os testes clínicos devem desempenhar (BURD, 2010).

O processo de desenvolvimento de um teste molecular para uso em diagnóstico é complexo e envolve vários níveis de avaliação e validação. Estes níveis incluem a validação analítica, validação clínica, a utilidade clínica e as implicações éticas, legais e sociais do teste. Em geral, a implementação de um novo teste diagnóstico, possui duas fases: a de desenvolvimento e a laboratorial. A fase de desenvolvimento envolve a avaliação da utilização do diagnóstico e a técnica do processo, assegurando que as medidas obtidas sejam relevantes para fins de diagnóstico. A fase laboratorial visa determinar se o desempenho do ensaio (sensibilidade analítica, sensibilidade diagnóstica, especificidade analítica, potencial de arraste, precisão e robustez) satisfaz os padrões necessários para um diagnóstico correto (MATTOCKS et al., 2010).

1.5.1 Gene alvo 16S rDNA e desenho de *primers*

Os genomas das espécies de *Mycoplasma* spp. são relativamente pequenos, variando de 580 kilobases (kb) (*M. genitalium*) a 1380 kb (*M. mycoides subsp. Mycoides*). As espécies de *Acholeplasma* spp. e *Spiroplasma* spp. possuem genomas de tamanhos maiores junto à classe *Mollicutes*, assim os outros gêneros por um processo evolutivo degenerativo e com perdas significativas de sequências genômicas possuem um genoma menor. Estes microrganismos apresentam como característica um baixo conteúdo de guanina e citosina (GC) com distribuição desigual ao longo do genoma. Esta variação em regiões codificantes do genoma tem relevância filogenética, uma vez que indica a natureza altamente conservada dos genes que codificam para os RNA ribossomal e transportador (WOESE, 1987).

A determinação da sequência do gene 16S rDNA forneceu as bases para uma análise filogenética sistemática de mollicutes (WEISBURG et al., 1989) e fez deste gene o marcador genético padrão ouro para taxonomia bacteriana. Alinhamentos computacionais revelaram a combinação de regiões altamente conservadas entre todas as bactérias, com regiões variáveis que permitem a diferenciação em níveis de espécies e gêneros (GRAY; SANKOFF; CEDERGREN, 1984). Os mollicutes apresentam de uma a duas cópias do gene 16S rDNA por genoma, o que faz deste um alvo de interesse para o desenvolvimento de testes moleculares. Contudo, o uso do gene 16S rDNA como alvo para detecção de espécies de *Mycoplasmas* spp. tem limitações. Os gêneros de bactérias muito próximos filogeneticamente das espécies de *Mycoplasma* spp., como por exemplo, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, podem ser detectados por *primers* desenvolvidos para espécies de *Mycoplasma* spp.. Diante disto, a Farmacopéia Européia preconiza que métodos de amplificação de ácidos nucleicos (do inglês, *Nucleic Acid Testing-NAT*) devem ser validados quanto à especificidade e que, se observado um comprometimento deste parâmetro, uma estratégia apropriada deve ser delineada para os resultados positivos.

A estratégia de desenho de *primers* e sondas para detecção de *Mycoplasma* spp. é efetuada utilizando programas específicos para desenho dos *primers*/sondas, banco de dados e sequências de genes alvo publicados para detecção de *Mycoplasma* spp.. Deve ser considerado para os ensaios NAT, o tamanho do produto amplificado, o tamanho dos *primers*, o conteúdo de G-C nos *primers* e o potencial de formação de dímeros de *primers*. Ainda, por meio de banco de dados, é possível verificar *in silico* o potencial de hibridação dos *primers* e sondas com as sequências de ácidos nucleicos de espécies de *Mycoplasma* spp. ou outras bactérias. O teste molecular deve ser avaliado quanto à eficiência dos *primers* selecionados e

deve-se assegurar a amplificação do material genético alvo. Isto feito, é necessário validar o método por meio da verificação de sua especificidade, sensibilidade, precisão e robustez.

1.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A identificação da replicação de *Mycoplasma* spp. e a formação de colônias são os métodos mais tradicionalmente utilizados para detecção destes microrganismos. Métodos alternativos ao teste microbiológico são baseados na detecção de elementos estruturais, como por exemplo, o DNA e o RNA. Dentre esses métodos, a amplificação de ácidos nucleicos (NAT) emprega a PCR convencional (*end-point*) e a PCR em tempo real. Desenvolvida por Kary Mullis em 1983, a PCR consiste em amplificar enzimaticamente *in vitro* uma região específica do DNA, no caso de *Mycoplasma* spp. a região do gene 16S rDNA. A localização da sequência alvo se dá pelos iniciadores (*primers*), oligonucleotídeos com 20-24 bases nitrogenadas, que interagem seletivamente com a fita molde do DNA por complementaridade entre bases (A-T; C-G). Nesta técnica, ocorre um aumento exponencial no número de fragmentos amplificados, uma vez que cada nova fita de DNA gerada serve como molde para a síntese de uma nova fita.

A PCR possui como etapas de amplificação do material genético a linha basal, na qual a quantidade de produto amplificado é insuficiente para detecção; a fase log, na qual a quantidade de produto dobra a cada ciclo; e a fase platô, na qual não ocorre mais o aumento no número de produtos devido ao esgotamento dos reagentes. A PCR convencional (*end-point*) é um método qualitativo, que consiste em separar o produto amplificado em gel por eletroforese e evidenciá-lo em luz ultravioleta por meio de corante fluorescente. Por sua vez, a PCR em tempo real é um método qualitativo e quantitativo, que pode ser realizada por meio de dois métodos básicos que são a detecção não específica, por meio de intercalantes fluorescentes de DNA dupla fita, ou por meio de sondas altamente específicas à sequência alvo. O ciclo de amplificação (do inglês, *threshold cycle*, Ct) no qual o sinal fluorescente é detectado pela primeira vez, é inversamente proporcional ao número de cópias (logaritmo) de ácidos nucleicos do alvo, isto é, quanto menor o Ct maior a concentração do alvo na amostra.

A PCR em tempo real apresenta como vantagens uma reação que ocorre em um só passo, o que evita processos pós-PCR, reduzindo a possibilidade de contaminação; é um método quantitativo, uma vez que é possível realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo; é mais rápido, mais sensível e permite adequar a especificidade do teste.

1.5.3 Validação da Metodologia

O processo de validação de um método diagnóstico engloba a verificação de parâmetros analíticos para demonstrar que o mesmo atende, por meio de seu desempenho, os requisitos necessários para seu uso. O método NAT para detecção de *Mycoplasma* spp. é considerado como um teste de limite para impurezas, uma vez que visa determinar a presença ou ausência do microrganismo (contaminante) em uma determinada amostra.

Os principais parâmetros requeridos para a validação de um teste limite são limite de detecção e especificidade. A robustez, a precisão e o potencial de arraste são descrições complementares na validade do método.

A especificidade é a capacidade que um ensaio possui em diferenciar analitos intimamente relacionados. Para a PCR, isto pode ser realizado mostrando que os *primers* e sondas amplificam a sequência alvo, mas falham na amplificação de moldes muito semelhantes. O parâmetro especificidade engloba a especificidade analítica e a diagnóstica. A especificidade analítica é a capacidade do teste em identificar exclusivamente uma determinada substância alvo, sem que ocorra reação cruzada e consequentemente sem resultados falso-positivos. A especificidade diagnóstica avalia a capacidade do teste de detectar como negativo uma amostra verdadeiramente negativa.

Por sua vez, a capacidade do teste de detectar a menor concentração de uma dada substância em uma amostra biológica é caracterizada como sensibilidade analítica. É por meio deste parâmetro que o limite de detecção é definido. Deste modo, a sensibilidade diagnóstica é a capacidade do teste de detectar como positivo uma amostra verdadeiramente positiva.

Complementar a estes parâmetros, a precisão de um teste mensura a habilidade do método em oferecer resultados consistentes de uma amostra quando realizados sob as mesmas condições em sucessivas repetições. Este parâmetro deve ser avaliado por meio de intra-ensaio (repetibilidade) e de inter-ensaio. No intra-ensaio, uma determinada amostra deve ser avaliada repetidamente, exatamente sob as mesmas condições, em um único momento (mesma “corrida”). Para o inter-ensaio, a mesma amostra deve ser avaliada novamente sob as mesmas condições, porém em as repetições devem ocorrer em momentos diferentes (corridas diferentes). Diferentemente, a robustez avalia o quanto pequenas variações na realização de um procedimento analítico pode interferir nos resultados de um teste. Para tal, uma determinada amostra deve ser avaliada repetidas vezes, em momentos diferentes e sob condições diferentes, dentre as quais estão os equipamentos utilizados, lotes de reagentes e operadores. Assim, a utilidade da validação do método não se restringe em atender as

exigências dos órgãos regulamentares. A determinação dos parâmetros é uma ferramenta auxiliar que indica os ajustes necessários a serem realizados nos novos testes moleculares desenvolvidos.

1.5.4 Justificativa do Estudo

A detecção de *Mycoplasma* spp. pode ser considerada um dos pontos críticos do processo de garantia da qualidade das células destinadas à infusão em pacientes, uma vez que estes microrganismos são dificilmente isolados em cultura, bem como identificados por microscopia óptica. Não há teste rápido e de baixo custo para sua detecção. O cultivo em ágar (teste padrão ouro) pode durar até 28 dias, tempo este que representa um risco para as outras culturas. A contaminação por *Mycoplasma* spp. pode gerar alterações estruturais e funcionais nas células que serão utilizadas tanto em terapias quanto em ensaios experimentais. Essas alterações comprometem principalmente as células destinadas à infusão em pacientes. O preparo do doador e paciente, o procedimento desconfortável de coleta (na maioria das vezes por punção da medula óssea) e o processo de expansão e cultivo das mesmas, migram para um segundo plano diante da possibilidade de gerar uma infecção por *Mycoplasma* spp. em um paciente imunossuprimido.

Para infusão em pacientes submetidos à terapia celular, as células-tronco expandidas *in vitro*, devem passar pelas etapas de avaliação por diferentes metodologias analíticas para garantir a segurança, pureza, potência, eficácia e estabilidade das células. Devido ao baixo tempo de prateleira (*shelf-life*), estas células devem ser infundidas o mais breve possível após o término do processo de expansão. Para tal, as metodologias analíticas para controle de qualidade dessas células, dentre as quais se inclui a detecção de *Mycoplasmas* spp., devem ser de simples execução, gerar resultados rápidos e possuir custo efetivo.

Em 14 de Março de 2011, foi publicada a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 9, a qual dispõe sobre os requisitos mínimos para o funcionamento de Centros de Tecnologia Celular (CTC) de células humanas (células somáticas e germinativas; células-tronco adultas, embrionárias e pluripotentes induzidas) e seus derivados para fins de pesquisa clínica e terapia. De acordo com o artigo 60 desta resolução, “antes de liberar as células humanas e seus derivados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia, seja para uso autólogo ou alogênico, cultivadas ou não, a fresco ou criopreservadas, com ou sem manipulação extensa, o CTC deve garantir sua segurança e qualidade”. Para que esta situação seja uma realidade nos centros de terapia celular brasileiros, faz-se necessário o uso de métodos de detecção disponíveis.

Entretanto, um dos fatores limitantes para adoção de metodologias já existentes é o alto custo da análise adicionado ao tempo necessário para importação dos kits comerciais. O preço médio por amostra dos kits comerciais baseados tanto na detecção enzimática quanto na molecular situa-se na faixa de R\$20,00 a R\$40,00/amostra. Uma vez que a recomendação das agências regulatórias é efetuar a detecção de *Mycoplasma* spp. a cada passagem ou troca de meio realizada, o custo desta análise utilizando os kits comerciais se torna inviável economicamente.

Assim, o desenvolvimento de um método diagnóstico para *Mycoplasma* spp. que seja rápido, mais sensível, específico, reprodutível e com custo reduzido é essencial para a atual realidade dos CTC. Este trabalho visa ao desenvolvimento de um teste molecular para detecção de espécies da classe *Mollicutes* de importância no controle de qualidade das culturas celulares. Essa estratégia permitirá a adoção de normas de qualidade na produção de células para fins de pesquisa e terapêuticos, somado a disponibilização de um insumo desenvolvido com tecnologia nacional. Além destes aspectos, os produtos biológicos serão fornecidos com adequada segurança e qualidade terapêutica para a comunidade.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma plataforma molecular utilizando a tecnologia da PCR em tempo real para detecção de *Mycoplasma spp*, *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma citri* e *Ureaplasma urealyticum* em culturas celulares.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar métodos moleculares: PCR convencional e PCR em tempo real *in house* para detecção *in silico* de quinze espécies diferentes do gênero *Mycoplasma*: *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. arthritidis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. penetrans*, *M. salivarium*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* e *M. pirum*; e três espécies de outros três gêneros: *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma citri* e *Ureaplasma urealyticum*;
- Construir e caracterizar um controle positivo plasmidial;
- Definir o tipo de amostra e o processamento das mesmas para obtenção do material genético (DNA);
- Determinar os parâmetros de validação: sensibilidade analítica, sensibilidade diagnóstica, especificidade analítica, potencial de arraste, precisão e robustez;
- Comparar a sensibilidade analítica da plataforma molecular com a do teste comercial *MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit* (Lonza);
- Realizar a microscopia eletrônica de varredura para validar resultados obtidos pela plataforma molecular;
- Realizar a análise filogenética para as espécies encontradas;
- Estabelecer um algoritmo para uso da plataforma molecular na rotina dos laboratórios de cultura celulares.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1 - Fluxograma da estratégia experimental para o desenvolvimento da plataforma molecular.

3.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e encontra-se registrado sob os processos de nº **3.500/2013** (referente à utilização do sobrenadante de culturas de células humanas) e nº **12.602/2013** (referente à utilização de células humanas cultivadas). O mesmo também foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e registrado sob processo nº 297/2012.008-01. Os documentos encontram-se nos apêndices I, II e III, respectivamente.

3.2 Desenho dos Primers

Para desenho dos *primers*, foram consideradas as espécies relevantes em termos de frequência nas contaminações em culturas celulares e de relações filogenéticas, totalizando 15 espécies diferentes do gênero *Mycoplasma*: *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinae*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. arthritidis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. penetrans*, *M. salivarium*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* e *M. pulmonis*; e três espécies de outros três gêneros: *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma citri* e *Ureaplasma*

urealyticum. Através do banco de dados *GenBank* foi obtido, para cada espécie citada acima, uma sequência de nucleotídeos referente ao gene 16S rDNA. Em seguida, foram realizados alinhamentos múltiplos destas sequências por meio dos programas *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5 (Ibis Biosciences) e *MEGA Sequence Data Explorer* versão 5.2. Após análise criteriosa dos alinhamentos, foram identificadas as regiões conservadas entre as espécies e passíveis de desenho de *primers*. Com base nestas regiões e com auxílio dos programas *PrimerQuest* e *OligoAnalyzer* versão 3.1 (IDT® - Integrated DNA Technologies) e do programa *Primer Express*® versão 3.0 (Applied Biosystems), foram desenhados dois conjuntos de *primers*, para os quais foram verificados parâmetros como temperatura de *melting* (T_m), formação de dímeros, conteúdo de guanina e citosina (GC%). Além destes dois conjuntos de *primers* desenhados, também foram utilizados outros dois conjuntos de *primers* descritos por van Kuppeveld et al. (1992). A fim de identificar as bibliotecas de sequências de nucleotídeos que se assemelham às sequências dos *primers* citados e verificar os alvos dos *primers*, estes foram analisados por meio do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*. A descrição dos *primers* obtidos e os conjuntos formados avaliados estão descritos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Descrição dos *primers* utilizados nas reações de PCR.

PRIMER	SEQUÊNCIA(5'-3')	T _m (°C)	GC (%)	REFERÊNCIA
<i>Forward 1</i>	ggTTgTCgTCAgCTCgTg	63,4	61,1	Macedo et al. *
<i>Forward 2</i>	gCAACgAgCgCAACC	63,1	66,6	Macedo et al. *
<i>Forward 3</i>	ACTCCTACgggAggCAgCAgTA	68,1	59,0	van Kuppeveld et al.
<i>Forward 4 (GPO-3)</i>	gggAgCAAACAaggATTAgATACCCT	66,9	48,0	van Kuppeveld et al.
<i>Reverse 1</i>	CCCgAgAACgTATTCACCg	65,4	57,8	Macedo et al. *
<i>Reverse 2 (MGSO)</i>	TgCACCATCTgTCACTCTgTTAACCTC	70,0	48,1	van Kuppeveld et al.

*: *Primers* desenhados nesta dissertação.

GC%: Porcentagem de guanina e citosina.

T_m (°C): Temperatura de *melting* em graus Celsius.

Tabela 3 – Descrição do tamanho do produto amplificado de acordo com o conjunto de *primers*.

CONJUNTO DE PRIMER	TAMANHO DO FRAGMENTO (pb)	REFERÊNCIA
<i>Forward 1 e Reverse 1</i>	332	Macedo et al. *
<i>Forward 2 e Reverse 1</i>	290	Macedo et al. *
<i>Forward 3 e Reverse 2</i>	715	van Kuppeveld et al.
<i>Forward 4 e Reverse 2</i>	270	van Kuppeveld et al.

*: *primers* desenhados nesta dissertação.

pb: pares de bases.

3.3 Otimização da PCR Convencional *in house*

Como ponto de partida para otimização da reação de PCR *in house* foi utilizado o protocolo fornecido pelo fabricante da *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) que consiste em: 10,0 µL de *buffer* PCR 10X (concentração final 1X), 3,0 µL de MgCl₂ 50 mM (concentração final 1,5 mM), 2,0 µL de dNTPs 10 mM (concentração final 0,2 mM), 5,0 µL de *primer forward* 10 µM (concentração final 0,5 µM), 5,0 µL de *primer reverse* 10 µM (concentração final 0,5 µM) e 0,25 µL de enzima *Taq DNA polimerase* 5 U/µL (concentração final 0,0125 U/µL). Para cada conjunto de *primer*, foram testados dois volumes diferentes de DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* 1 ng/µL (ATCC® 23206™), 5,0 µL e 10,0 µL; e respectivamente dois volumes de água nuclease-free, 69,75 µL e 64,75 µL, para completar um volume final de 100,0 µL. As reações foram incubadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) sob o seguinte programa de amplificação: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos (desnaturação)/ 55°C por 30 segundos (anelamento)/ 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão); e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos, com manutenção final da reação em 4°C.

A partir dos resultados obtidos, foi selecionado um conjunto de *primer*, *forward 4* e *reverse 2*, para o qual procedeu-se a otimização da reação. Para o conjunto de *primer* selecionado, foram avaliados gradientes de volumes de reagentes e de amostra, bem como gradiente de temperatura no programa de ciclagem. Assim, o protocolo e programa mais adequado foram obtidos e denominados PCR convencional *in house*: 5,0 µL de *buffer* PCR 10X (concentração final 1X), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM (concentração final 1,5 mM), 1,0 µL de dNTPs 10 mM (concentração final 0,2 mM), 1,0 µL de *primer forward* 10 µM (concentração final 0,2 µM), 1,0 µL de *primer reverse* 10 µM (concentração final 0,2 µM) e

0,25 µL de enzima *Taq DNA polimerase* 5 U/µL (concentração final 0,025 U/µL), 5,0 µL de amostra de DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™) 1 ng/µL e 35,25 µL de água nuclease-free para completar um volume final de 50,0 µL. As reações foram incubadas em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cyclers* (Applied Biosystems) sob o seguinte programa de amplificação: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por 50 segundos (desnaturação)/ 55°C por 50 segundos (anelamento)/ 72°C por 1 minuto (extensão); e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos, com manutenção final da reação em 4°C.

3.4 Construção do Controle Positivo

Para evitar o manuseio do microrganismo e sua eventual propagação, foi construído um controle positivo através da inserção do fragmento referente ao gene codificador da subunidade 16S ribossomal (16S rDNA) em um vetor.

3.4.1 Reação de Amplificação do Fragmento e Ligação no Vetor pCR2.1-TOPO

A sequência do gene 16S rDNA foi amplificada a partir do DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™). Para isto, utilizou-se a PCR *SuperMix High Fidelity* (Invitrogen), que tem como característica a amplificação de moldes de ácidos nucleicos com alta fidelidade na sequência de bases nitrogenadas. A reação foi preparada adicionando-se 20,0 µL desta PCR SuperMix High Fidelity, 1,0 µL do *primer forward* 4 5 µM (concentração final 0,2 µM), 1,0 µL do *primer reverse* 2 5 µM (concentração final 0,2 µM), e 3,0 µL do DNA genômico *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™) 1 ng/µL (concentração final 0,12 ng/µL), obtendo um volume final de 25,0 µL. A reação foi incubada em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cyclers* (Applied Biosystems) sob o programa de amplificação utilizado para a PCR convencional *in house*: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por 50 segundos/ 55°C por 50 segundos/ 72°C por 1 minuto; e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos, com manutenção final da reação em 4°C. Ao final da reação, 5,0 µL do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 2% para verificação da amplificação. Em seguida, foi realizada a reação de ligação do fragmento amplificado (Figura 2) ao vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen), de acordo com as instruções do kit.

Figura 2 – A) Representação esquemática do vetor de sequenciamento pCR[®] 2.1-TOPO. O vetor possui o gene *LacZα* que codifica β-galactosidase, o sítio múltiplo de clonagem; uma origem de replicação (*F1 ori*); gene de resistência a Kanamicina (*Kanamycin*); gene de resistência a Ampicilina (*Ampicillin*) e origem de replicação para propagação em *E.coli* (*ColE1 ori*). **B) Representação esquemática da ligação do fragmento amplificado de DNA no vetor de sequenciamento pCR[®] 2.1-TOPO.**

3.4.2 Transformação de Bactérias Competentes

A transformação foi realizada através da inserção do DNA recombinante (vetor pCR2.1-TOPO ligado ao fragmento amplificado de 16S rDNA) em bactérias competentes Mach1[™] -T1^R (Invitrogen). Foi utilizado o método de choque térmico (transformação com cloreto de cálcio), o qual consistiu em adicionar 2,0 µL da reação de ligação a uma alíquota de 40,0 µL de bactérias competentes e incubar em gelo durante 30 minutos. Em seguida, realizou-se o choque térmico a 42°C por 1 minuto, com posterior e imediata incubação em gelo por mais 15 minutos. Foram adicionados 270,0 µL de S.O.C Medium (Invitrogen) à 37°C (triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl₂ 10 mM; MgSO₄ 10 mM e glicose 20 mM) à reação de transformação, incubando-a à 37°C por 60 minutos. Todo o volume de bactéria foi semeado em placas contendo meio LB (Luria-Bertani) sólido (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; agar-ágar 1,5%) previamente preparado com: 40,0 mL de meio LB, 40,0 µL de ampicilina 100 mg/mL (concentração final 100 µg/mL), 40,0 µL de isopropílico β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1M e 80,0 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo (X-Gal) 2%. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. Após incubação das placas a 37°C por 14 horas, foi realizada a seleção de dez clones.

3.4.3 Expansão dos Clones em Meio Líquido

Cada clone selecionado foi inoculado em 5,0 mL de meio LB líquido (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%) com 5,0 µL de ampicilina (concentração final 100µg/mL), e incubado sob agitação, a 37°C, por 8 horas. O crescimento bacteriano foi avaliado quanto à turvação do meio líquido. Um clone foi selecionado para dar continuidade aos experimentos. Os demais clones foram armazenados em *freezer* -80°C com glicerol 70% na proporção de 1:2.

3.4.4 Obtenção do DNA Plasmidial

Após expansão do clone em meio líquido, as bactérias foram coletadas por centrifugação (5000 x g; 20 minutos; 4°C). A partir do pellet de bactérias do clone selecionado, o DNA plasmidial foi extraído através do Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) seguindo as orientações do fabricante. O DNA plasmidial obtido foi quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm.

3.4.5 Amplificação do DNA Plasmidial e DNA Genômico por PCR

Através da PCR convencional *in house*, foi realizada a amplificação do DNA plasmidial do clone para confirmação da presença do inserto (16S rDNA) no plasmídeo. O mesmo foi feito para o DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™), a fim de produzir um controle positivo para a reação de sequenciamento.

Uma vez confirmada a presença do inserto no DNA plasmidial do clone, outra reação de PCR com DNA plasmidial foi realizada utilizando os *primers forward* M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e *reverse* M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') do vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) para obter o produto amplificado a ser utilizado no sequenciamento (Figura 3). Realizou-se a seguinte reação de amplificação: 1,5 µL de *buffer* PCR 10X (concentração final 1X), 0,45 µL de MgCl₂ 50 mM (concentração final 1,5 mM), 1,5 µL de dNTPs 1,25 mM (concentração final 0,125 mM), 0,63 µL de *primer forward* M13 2,5 µM (concentração final 0,105 µM), 0,63 µL de *primer reverse* M13 2,5 µM (concentração final 0,105 µM), 0,20 µL de enzima *Taq DNA polimerase* 5 U/µL (concentração final 0,066 U/µL), 1,0 µL de DNA plasmidial (241,30 ng/µL) e 9,19 µL de água *nuclease-free* para um volume final de 15,0 µL. A reação foi incubada em termociclador Veriti® 96-Well Thermal

Cycler (Applied Biosystems) sob o programa de amplificação: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 95°C por 40 segundos/ 60°C por 40 segundos/ 72°C por 55 segundos; e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos, com manutenção final da reação em 4°C.

3.4.6 Sequenciamento do Produto Amplificado do DNA Plasmidial e DNA Genômico

Foi realizado sequenciamento do fragmento de 16S rDNA do DNA plasmidial e do DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™) utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Para o sequenciamento do produto amplificado do DNA plasmidial foi utilizado o *primer forward* M13 do vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen), enquanto que para sequenciar o produto amplificado de DNA genômico foi utilizado o *primer forward* 4 da PCR convencional *in house*. A reação consistiu em 2,0 µL de tampão de sequenciamento 5X (concentração final 1X), 2,0 µL de *BigDye® Terminator v3.1*, 1 µL de *primer forward* M13 ou de *primer forward* 4 2,5 µM (concentração final 0,25 µM), 1,0 µL de produto de PCR do DNA plasmidial e 4,0 µL de água livre de RNase para obtenção de um volume final de 10,0 µL. A reação foi incubada em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 1 minuto; 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos; e manutenção final da reação em 4°C. Em seguida, a precipitação do produto do sequenciamento do DNA foi realizada com a adição de 30,0 µL de água Milli-Q e 60,0 µL de isopropanol absoluto seguido de incubação por 20 minutos em temperatura ambiente. O DNA precipitado foi obtido através de centrifugação a 3.200 x g durante 45 minutos. Após descartar o sobrenadante, o DNA precipitado foi lavado com 200,0 µL de etanol 70% (v/v) gelado. A amostra foi centrifugada a 3.200 x g por 20 minutos e o etanol foi removido através de *spin* invertido da placa. Em seguida, o DNA foi mantido em estufa a 37°C, por 15 minutos, para secagem. As amostras foram ressuspensas em *Hi-Di Formamida* (Applied Biosystems), desnaturadas a 95°C por 3 minutos e aplicadas no sequenciador automático *ABI 3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Os eletroferogramas obtidos foram analisados no programa *3500 Data Collection* (Applied Biosystems) e posteriormente convertidos em sequências de nucleotídeos por meio do programa *DNA Sequencing Analysis* versão 5.4 (Applied Biosystems). A montagem das sequências consenso foi realizada pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 (Ibis Biosciences) e estas foram analisadas por meio do algoritmo *BLAST*.

3.4.7 Linearização do DNA Plasmidial com Enzima de Restrição

O DNA plasmidial do clone um foi digerido com a enzima FastDigest *Hind III* (Thermo Scientific) (Figura 3), de modo a linearizar o DNA plasmidial. A reação de digestão foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. O produto obtido da reação de digestão foi purificado utilizando-se o kit *PureLink® PCR Purification* (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante.

Figura 3 – Representação esquemática do sítio de clonagem do vetor pCR®2.1-TOPO. Na sequência de nucleotídeos estão descritas a região de acoplamento dos *primers* M13 *forward* e *reverse* (vermelho), o sítio de restrição da enzima *Hind III* (azul) e a região de inserção do fragmento amplificado 16S rDNA (preto).

3.5 Otimização da PCR em Tempo Real

Para a reação de amplificação em tempo real foi utilizado intercalante fluorescente de DNA dupla fita *BRYT Green®* (*GoTaq® qPCR Master Mix*, Promega). A otimização da reação foi baseada na PCR convencional *in house*, da qual foram mantidos volumes e concentrações dos *primers forward* 4 e *reverse* 2. Dentre os volumes avaliados de *GoTaq® qPCR Master Mix* e água nuclease-free foi estabelecido respectivamente 7,5 µL e 0,5 µL. Assim, o protocolo da reação de PCR em tempo real *in house* ficou definido da seguinte forma: 1,0 µL de *primer forward* 10 µM (concentração final 0,66 µM), 1,0 µL de *primer reverse* 10 µM (concentração final 0,66 µM), 7,5

μL de *GoTaq[®] qPCR Master Mix 2X* (concentração final 1X), 5,0 μL do controle positivo (DNA plasmidial) e 0,5 μL de água nuclease-free para completar um volume final de 15,0 μL . Os parâmetros do ciclo de amplificação ficaram assim estabelecidos: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos e 95°C por 15 minutos (*holding stage*); 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos (*cycling stage*); e 1 ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 30 segundos e 60°C por 15 segundos (*melting curve stage*). A reação de amplificação foi realizada no equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.6 Amostras e Processamento

3.6.1 Amostras

Foram utilizados concentrados celulares e os respectivos sobrenadantes para padronizar o tipo de amostra e o processamento das mesmas. Estas amostras foram provenientes das culturas de células dos laboratórios do Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.6.2 Controle Negativo

Como controle negativo foi utilizado meio de cultura virgem, isto é, meio recém preparado e sem contato prévio com células.

3.6.3 Processamento das Amostras

Com intuito de obter o DNA bacteriano, mesmo quando em baixas concentrações, os concentrados celulares (1×10^6 células em 200,0 μL de tampão fosfato-salino 1X) tiveram seu DNA extraído por meio do *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante; e seus respectivos sobrenadantes, previamente centrifugados a 200 x g por 5 minutos, foram processados através do *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante.

3.7 Validação do Método

Os parâmetros sensibilidade analítica, sensibilidade diagnóstica, especificidade analítica, potencial de arraste, precisão e robustez foram determinados para validar o método.

3.7.1 Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica de um teste refere-se a menor concentração detectável de um alvo (analito) em uma amostra. Para determinar este parâmetro foi construída uma curva de calibração a partir do controle positivo e a sensibilidade analítica foi calculada pelo método estatístico *Probit* através do programa *SPSS Statistics 17.0* fornecido pela *International Business Machines* (IBM), considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%.

3.7.1.1 Construção da Curva de Calibração

Foi realizada uma conversão de unidades (Applied Biosystems), na qual a concentração do controle positivo foi convertida de g/μL para número de cópias. Para isto, foi calculada a massa (gramas/cópia) de uma única molécula do DNA plasmidial (controle positivo) usando a fórmula $m = n (1,096 \cdot 10^{-21} \text{ g/bp})$, onde n é a soma do número de pares de bases do plasmídeo com o inserto. A massa obtida foi multiplicada pelos números de cópias estabelecidos (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 e 1 cópia) para formar os pontos da curva de calibração. Assim, a correspondência entre a massa do DNA plasmidial e o número de cópias de cada ponto da curva foi obtida. As massas dos respectivos pontos da curva foram então divididas pelo volume (μL) de amostra usada na reação de PCR, a fim de obter a concentração final (C_2 em g/μL) do DNA plasmidial de cada ponto. A concentração do DNA plasmidial estoque (C_1 =concentração inicial) foi determinada por espectrofotometria. Isto feito e, considerando um volume final (V_2) de 100,0 μL, calculou-se com a fórmula $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ o volume do DNA plasmidial estoque (V_1) necessário para preparar o primeiro ponto (10^5 cópias) da curva de calibração. Os demais pontos (10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 e 1 cópia) foram preparados através de diluições seriadas na razão 10 a partir do primeiro ponto.

3.7.1.2 Teste de Sensibilidade Analítica

O teste de sensibilidade analítica foi realizado em três dias consecutivos. Cada dia de teste foi executado por um operador diferente. Utilizando a curva de calibração construída, cada operador pipetou reações de PCR compostas por oito réplicas de cada ponto da curva (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 e 1 cópia). Todos os operadores utilizaram os mesmos reagentes e pipetas. Este teste de sensibilidade foi feito tanto para a PCR convencional *in house* quanto para a PCR em tempo real *in house*.

3.7.2 Especificidade Analítica

A especificidade analítica de um teste refere a sua capacidade de detectar exclusivamente um único alvo, avaliando ocorrência de reação cruzada e consequentemente de resultados falso-positivos. Para avaliar este parâmetro, a plataforma molecular foi testada com DNA de três bactérias Gram-positivas de relação filogenética próxima ao *Mycoplasma* spp.: *Streptococcus uberis*, *Lactobacillus sakei* e *Clostridium perfringens*. O material genético destas bactérias foi extraído pelo QIAamp DNA Blood Mini Kit (Appendix D – QIAGEN) e quantificado por espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm. Juntamente com o DNA destas bactérias foi quantificada uma amostra do DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™). Com base nestas quantificações, diluições seriadas na razão 10 foram realizadas para o material genético de todas as bactérias. Cada ponto de diluição das bactérias foi testado em oito réplicas pela PCR em tempo real *in house*. A cada teste de especificidade analítica realizado, foram testados em triplicata os pontos da diluição do DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii*. Além disto, a especificidade analítica também foi verificada quanto ao DNA de célula eucariótica. Para isto, a PCR em tempo real *in house* foi aplicada em 50 amostras de DNA obtidos a partir de concentrados celulares (1×10^6 células).

Os produtos de PCR das amostras que apresentaram amplificação na PCR em tempo real *in house*, foram aplicados em gel de agarose (2%). Foi avaliado o tamanho das bandas e as mesmas foram excisadas do gel e purificado pelo *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN), conforme orientações do fabricante. As amostras purificadas foram sequenciadas conforme o protocolo utilizado para o sequenciamento do DNA genômico descrito na subseção 3.4.6.

3.7.3 Sensibilidade Diagnóstica

A sensibilidade diagnóstica demonstra a capacidade de detectar amostras verdadeiramente positivas, mensurando a ocorrência de resultados falso-negativos. Para isto, foram selecionadas 70 amostras de DNA, obtidos a partir de sobrenadantes de cultura de células, e positivas pela PCR convencional *in house*, a qual foi considerada teste *Gold Standard*. Estas amostras sabidamente positivas e caracterizadas por sequenciamento foram avaliadas em triplicata pela PCR em tempo real *in house*. A análise estatística foi realizada por meio do programa SAS versão 9.2 (*Statistical Analysis System – SAS Institute*).

3.7.4 Potencial de Arraste

Este parâmetro indica o potencial de contaminação de uma reação devido ao arraste de DNA de uma amostra positiva para uma amostra negativa. Para isto, um modelo de “mesa de xadrez” foi utilizado. O teste foi composto por 96 reações, no qual uma amostra positiva foi pipetada ao lado de uma amostra negativa alternadamente. O controle positivo e controle negativo (meio de cultura virgem) foram utilizados como amostras. Assim, 48 reações foram realizadas tanto para a amostra positiva, quanto para a amostra negativa.

3.7.5 Precisão

A precisão de um teste é a habilidade do método em oferecer resultados consistentes de uma amostra quando realizados sob as mesmas condições em sucessivas repetições. Este parâmetro foi avaliado por meio de intra-ensaio (repetibilidade) e de inter-ensaio. Para realizar estes dois ensaios foi utilizado o controle positivo plasmidial com 10^3 cópias. O intra-ensaio consistiu em pipetar 8 réplicas desta amostra, em uma única corrida de PCR em tempo real *in house*. Para intra-ensaio, cada uma das 8 réplica foi realizada em uma corrida diferente. Para ambos os testes foram mantidas as mesmas condições, isto é, mesmos lotes de reagentes, equipamento e operador. Por meio dos resultados obtidos foram calculadas as médias dos Ct, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos testes.

3.7.6 Robustez

Este parâmetro avalia o quanto pequenas variações na realização de um procedimento analítico pode interferir nos resultados. A fim de mensurar a robustez, o controle positivo plasmidial com 10^4 cópias foi avaliado pela PCR em tempo real *in house* por 8 vezes. Os testes foram realizados em dias e equipamentos diferentes, com lotes de reagentes diferentes e por operadores distintos. Por meio dos resultados obtidos foram calculadas as médias dos Ct, o desvio padrão e o coeficiente de variação dos testes.

3.8 Teste Comercial para detecção de *Mycoplasma* spp.

Dentre as metodologias analíticas para controle de qualidade das células utilizadas na terapia celular está o teste comercial *MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit* (Lonza), o qual tem como princípio a detecção bioquímica de enzimas produzidas por *Mycoplasmas* spp..

Foram coletados 2,0 mL de sobrenadante de cultura de células (n=134), os quais foram centrifugados a 200 x g por 5 minutos. O teste comercial *MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit* (Lonza) foi realizado com 100,0 µL do sobrenadante conforme as instruções do fabricante. Em paralelo, 200,0 µL destes sobrenadantes foram processados (subseção 3.6.3) e o material genético foi testado pela plataforma molecular *in house*.

3.8.1 Comparação da Plataforma Molecular *in house* com o Teste Comercial

Foram realizadas duas análises comparativas entre os resultados obtidos pela plataforma molecular *in house* e pelo teste comercial. Na primeira análise, foram avaliados os resultados obtidos pelos dois métodos quanto à concordância de positividade. Todas as amostras positivas pela PCR em tempo real *in house* foram submetidas ao sequenciamento de DNA genômico descrito na subseção 3.4.6, com a seguinte modificação: os produtos de PCR foram purificados pelo *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN) conforme orientações do fabricante.

Na segunda análise, foi realizada a curva de sensibilidade para os dois testes em questão e comparados os limites de detecção de cada método. Para tanto, foram selecionadas três amostras com resultado positivo em ambos os testes e caracterizadas por sequenciamento. Foi utilizado como o ponto inicial (P₁) para a realização das diluições 1,0 mL do sobrenadante centrifugado. A partir do P₁, foram construídos nove pontos de diluições seriadas (1:5) para um volume final de 1,0 mL. Para cada ponto da curva (P₁ a P₁₀) foi realizado o teste comercial *MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit* (Lonza) e a PCR em tempo real *in house* em duplicata. Por meio do valor de Ct dos pontos de interesse, o número de cópias presente em cada ponto foi calculado utilizando a equação da reta obtida na curva de calibração do teste de sensibilidade analítica. Assim fez-se a comparação entre os limites de detecção do teste comercial e do *in house*.

3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Sobrenadante e concentrado celular de seis células em cultura foram monitorados pela PCR em tempo real *in house*. Destas, três foram selecionadas. A primeira, célula-tronco mesenquimal de tecido adiposo (MSC-TA); a segunda, célula-tronco mesenquimal de medula óssea (MSC-MO); e a terceira, célula de linhagem renal embrionária humana (HEK 293 – *Human Embryonic Kidney 293 cells*).

Para realizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV), 1×10^5 células, de cada amostra, foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas previamente preparadas com *Biobond Tissue Section Adhesive* (Electron Microscopy Sciences – EMS). Durante o preparo das amostras para a MEV, foram recolhidos 1×10^6 células de cada amostra para realizar a PCR em tempo real *in house*. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C, as células plaqueadas tiveram os sobrenadantes recolhidos e armazenados para realizar o teste comercial *MycoAlert[®] Mycoplasma Detection Kit* (Lonza) e a PCR em tempo real *in house*. As células foram lavadas, cuidadosamente por três vezes, com tampão fosfato-salino 1X (PBS). Após remoção completa do PBS, a cada poço foi adicionado 1,0 mL de fixador glutaraldeído 3% a 37°C. A placa foi mantida em temperatura ambiente por 20 minutos e depois incubada em geladeira (4 a 8°C) por 1 hora e 40 minutos. O fixador foi removido e as amostras foram lavadas cuidadosamente por três vezes com PBS 1X a 4°C. O tampão foi retirado completamente e adicionou-se, por poço, 1,0 mL de tetróxido de Ósmio 1% a 4°C, incubando por 2 horas. O tetróxido de Ósmio foi removido e as amostras foram lavadas cuidadosamente por três vezes com PBS 1X. O tampão foi completamente removido e iniciou-se a desidratação das amostras. Para isto, as mesmas foram mantidas, sucessivamente, em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 95%) por 5 minutos a temperatura ambiente para cada concentração. Após a remoção do etanol 95%, as amostras foram incubadas em etanol 100% por três vezes de 10 minutos. As lamínulas foram removidas dos poços e colocadas no equipamento *Critical Point Dryer CPD 030* (Bal-Tec) para remoção de líquido das células e secagem ao ponto crítico. Em seguida, as lamínulas foram fixadas em suporte (*Stubs*) por meio de cola de carvão (coloidal grafite). Após 24 horas em temperatura ambiente para secagem da cola, os *Stubs* foram colocados no equipamento *Sputter Coater SCD 050* (Bal-Tec) para realizar nas amostras o banho de ouro 24 quilates. Ao final desta etapa, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura.

3.10 Análise filogenética

Por meio do banco de dados *GenBank*, sequências de nucleotídeos referentes ao gene 16S rDNA foram selecionadas para 27 espécies de *Mycoplasma* spp., *Acholeplasma laidlawii*, duas espécies de *Ureaplasma* e três espécies de *Spiroplasma*. Os números de acesso do *GenBank*, para os genomas das referidas bactérias, encontram-se no apêndice IV. Para compor o *outgroup*, foram escolhidas as sequências para *Clostridium innocum* (GU968167.1), *Clostridium ramosum* (AB627078.1), *Lactobacillus vitulinus* (AB425916.1), *Lactobacillus*

plantarum (AB741780.1), *Yersinia pestis* (AJ232238.1) e *Escherichia coli* (D12649.1). Estas sequências, juntamente com as sequências obtidas no decorrer deste trabalho, foram alinhadas pelo método *ClustalW* no programa *MEGA Sequence Data Explorer* versão 5.2. Em seguida, devido ao número elevado de *gaps* que teoricamente poderiam comprometer a análise filogenética, os alinhamentos foram editados manualmente. As sequências idênticas foram excluídas no programa *DAMBE* versão 5.3.48. Para avaliar o sinal filogenético do alinhamento foi utilizado o teste *Permutation Tail Probability* (PTP) executado pelo programa *PAUP* versão 4.0. A árvore filogenética foi construída por meio do programa *PHYLIP* versão 3.69, com implicação do método *Neighbor-Joining* (agrupamentos de vizinhos - NJ) e modelo matemático *Kimura-2-parameter*, ambos implementados pelo programa. O suporte estatístico entre os ramos da árvore foi realizado usando o teste *Bootstrap* com 1000 repetições. A visualização final da árvore foi realizada pelo programa *TreeView* versão 4.5.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Seleção de *Primers*

Após o alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos do gene 16S rDNA de cepas intra-espécie, foi selecionada uma cepa representante para cada espécie de *Mycoplasma* spp. avaliada. O critério de seleção utilizado foi a sequência de nucleotídeos mais frequente entre as cepas. O alinhamento múltiplo das cepas representantes foi considerado tanto para realizar o desenho (*forward* 1; *forward* 2; *reverse* 1) quanto para analisar os *primers* (*forward* 3; *forward* 4; *reverse* 2) descritos por van Kuppeveld et al. (1992). A espécie *Mycoplasma hominis* (EU596509.1) foi escolhida como sequência referência do alinhamento por apresentar 100% de identidade de nucleotídeos com o *primer forward* 4 e perfeita complementaridade ao *primer reverse* 2. Ao analisar o alinhamento múltiplo, não foram encontradas regiões conservadas que atendessem aos critérios para o conteúdo de guanina e citosina, tamanho dos *primers* e do fragmento produzido. Na figura 4, é possível observar as cepas selecionadas e seus respectivos números de acesso no banco de dados *GenBank*; o alinhamento múltiplo das regiões dos *primers* de escolha *forward* 4 e *reverse* 2; e a discordância entre nucleotídeos para cada espécie e *primer*.

Figura 4 – Alinhamento múltiplo das regiões dos *primers forward* 4/ *reverse* 2 e as sequências de referência obtidas do *GenBank*. A) Espécies de referência com os respectivos números de acesso ao *GenBank*; B) *Primer forward* 4 (5'-3') sinalizado pela caixa vermelha e alinhamento múltiplo da região do mesmo; C) Sequência reserva complementar ao *primer reverse* 2 (5'-3') sinalizada pela caixa vermelha e alinhamento múltiplo da região do mesmo. Linhas pontilhadas: indicam homogeneidade genética entre as cepas de referência; Nucleotídeo representado por letra na linha pontilhada: indica mutação pontual conforme comparação entre genomas das cepas de referência.

4.2 Otimização da PCR Convencional e em Tempo Real *in house*

Ao avaliar pela PCR convencional os *primers* obtidos, observou-se que os conjuntos *forward 1/reverse 1* e *forward 2/reverse 1* amplificavam as reações controle sem *template* (NTC) e que o conjunto de *primer forward 3/reverse 2* não amplificou a amostra positiva (DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii*). Por esses motivos, estes conjuntos de *primers* desenhados foram eliminados. Como o conjunto *forward 4/reverse 2* apresentou resultados mais consistentes, com ausência de amplificação nas reações de NTC e com produto amplificado no tamanho esperado para as amostras positivas (Figura 5), o mesmo foi selecionado para a padronização da reação de *end-point*.

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado (270 pb) pela PCR convencional *in house* realizada com os *primers forward 4 e reverse 2*. M: marcador λ X174 com indicação do tamanho do fragmento (281 pb - 271 pb); 1 e 3: reação com 10 μ L de DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (1 ng/ μ L - ATCC[®] 23206); 2 e 4: 5 μ L DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (1 ng/ μ L - ATCC[®] 23206); NTC: reações controle sem *template*.

Considerando estes resultados, a PCR em tempo real *in house* foi padronizada com o mesmo conjunto de *primers* e com o controle positivo plasmidial. Observou-se que o controle positivo construído contendo 1×10^4 cópias (oito réplicas) apresentou o intervalo da temperatura de *melting* entre 83,1 e 83,6°C (Figura 6), enquanto o intervalo das amostras sabidamente positivas manteve-se entre 81,0 a 84,0°C.

Figura 6 – PCR em tempo real *in house* com os *primers* selecionados *forward 4/reverse 2*. O controle positivo contendo 1×10^4 cópias foi utilizado como amostra e pipetado em oito réplicas. **A) Curva de amplificação: Ct = 23,6 representa a média dos Ct das oito réplicas; o *threshold* (0,356024) está indicado pela linha azul. **B)** Curva de *melting*: as réplicas apresentaram temperatura de *melting* entre 83,1 e 83,6°C.**

As amostras que amplificaram com temperatura de *melting* fora do intervalo de 81,0 a 84,0°C tiveram seus produtos de PCR aplicados em gel de agarose e não foi observada a presença de bandas. Assim, o intervalo citado acima foi estabelecido como temperatura de *melting* a ser considerada para análise.

4.3 Construção do Controle Positivo

Todas as etapas do processo de construção do controle positivo até o seu sequenciamento foram monitoradas pela reação de PCR convencional. Ao realizar a amplificação do DNA plasmidial com os *primers forward* M13 e *reverse* M13 (*primers* do vetor pCR2.1-TOPO para verificar a ligação vetor-fragmento), obteve-se um fragmento de 471 pb; enquanto a amplificação do DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (ATCC[®] 23206[™]) com os *primers forward 4* e *reverse 2* gerou um fragmento de 270 pb (Figura 7).

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose para caracterização do controle positivo. M: marcador $\square$ X174; A) 1: produto amplificado (471 pb) a partir do DNA plasmidial (controle positivo) com os *primers forward* M13 e *reverse* M13 do vetor pCR2.1-TOPO; B) 1: produto amplificado (270 pb) a partir do DNA genômico (*Acholeplasma laidlawii*- ATCC®) com os *primers forward* 4 e *reverse* 2 da PCR convencional *in house*.

Esses produtos de PCR foram sequenciados e avaliados quanto à composição e à sequência de nucleotídeos presentes em ambos. Os eletroferogramas resultantes evidenciaram um sequenciamento de boa qualidade, com picos definidos para cada nucleotídeo (Figura 8).

Figura 8 – Eletroferograma parcial obtido do sequenciamento do controle positivo. Em evidência, região representativa do inserto (16S rDNA) do DNA plasmidial. Picos únicos e definidos representando cada nucleotídeo inserido para compor a sequência do DNA.

As sequências de nucleotídeos do 16S rDNA obtidas para o controle positivo e para o DNA genômico foram alinhadas com a sequência referência fornecida pela ATCC e obtida do *GenBank* (CP000896.1: genoma completo de *Acholeplasma laidlawii* PG-8A) (Figura 9). A sequência do controle positivo que antecede a região do *primer forward* 4 e que sucede a região do *primer reverse* 2 correspondem ao vetor pCR2.1®-TOPO.

Figura 9 – Alinhamento da sequência do 16S rDNA do controle positivo e DNA genômico com a sequência de referência (CP000896.1). Controle positivo sequenciado com *primer forward* M13 do vetor pCR2.1®-TOPO; DNA genômico sequenciado com *primer forward* 4 da PCR *in house*. Linhas pontilhadas: indicam homogeneidade genética entre as cepas de referência; Tracejado: representa deleções nucleotídicas. A sequência e localização do *primer forward* 4 e a localização do reverso e complementar do *primer reverse* 2 estão sinalizados por caixas vermelhas.

A análise do alinhamento mostrou cinco mutações nucleotídicas na região genômica do *primer reverse* 2 tanto para o controle positivo (posições 421, 429, 430, 431 e 436, conforme a numeração do *BioEdit*) quanto para o DNA genômico (posições 200, 201, 202, 204 e 211). Para este último, também ocorreu a não concordância dos nucleotídeos nas posições 200, 201, 202, 204 e 211. A linha tracejada representa deleções nucleotídicas, como pode ser visto nas posições 209 e 221. Através de análise pelo programa *BLAST*, o controle positivo e o DNA genômico apresentaram, respectivamente, 99% e 97% de identidade genética com a sequência referência. Dessa maneira, confirmou-se a identidade do controle positivo por meio de sua caracterização, o que permitiu a utilização do mesmo nos experimentos.

4.4 Validação do Método

4.4.1 Sensibilidade Analítica

O teste de sensibilidade analítica foi estabelecido com o controle positivo descrito anteriormente e executado por três operadores distintos. Com base nos resultados obtidos definiu-se o limite de detecção (LOD) da PCR convencional *in house* e da PCR em tempo real *in house*.

Para a PCR convencional *in house*, o limite de detecção foi de aproximadamente 100 cópias/5 µL (*Probit*, IC 95% de 16,97 a 142,43), enquanto que para PCR em tempo real *in house* foi de aproximadamente 5 cópias/5 µL (*Probit*, IC 95% de 5,26 a 5,76). Para ambas foi considerado o intervalo de confiança de 95%. Na tabela 4, estão descritos os resultados obtidos em cada análise tanto para a PCR convencional quanto para a PCR em tempo real.

Tabela 4 – Sensibilidade analítica (IC 95%) para os métodos de detecção de *Mycoplasma* spp. por PCR convencional e em tempo real *in house*.

PONTOS DA CURVA	PCR CONVENCIONAL <i>IN HOUSE</i>			PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i>		
	Réplicas Amplificadas			Réplicas Amplificadas		
	Operador 1	Operador 2	Operador 3	Operador 1	Operador 2	Operador 3
10 ⁵	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
10 ⁴	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
10 ³	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
10 ²	7/8	8/8	7/8	8/8	8/8	8/8
10 ¹	0/8	6/8	0/8	8/8	8/8	8/8
10 ⁰	0/8	0/8	0/8	2/8	4/8	2/8
PROBIT *	142,43	16,97	142,43	5,26	5,76	5,26

*: Método estatístico usado para calcular o limite de detecção dos testes *in house*. Intervalo de confiança de 95%. Foram realizadas oito réplicas das seis diluições (definidas como pontos da curvas).

A figura 10 representa o teste de sensibilidade realizado para a PCR convencional. Observou-se a amplificação, com bandas definidas, de todas as réplicas até a diluição de 10³ cópias; a amplificação de sete réplicas, com bandas de difícil visualização, em 10² cópias; e ausência de amplificação em 10¹ e 10⁰ cópias.

Figura 10 – Teste de sensibilidade analítica realizado para a PCR convencional *in house*: eletroforese em gel de agarose. Cada imagem representa um dos pontos da curva de calibração com oito réplicas. 10^2 cópias: réplicas com difícil visualização das bandas; 10^1 cópias: total ausência de amplificação; M: marcador $\square$ X174.

O teste de sensibilidade da PCR em tempo real *in house* amplificou as oito réplicas até o ponto da curva de 10^1 cópias e duas réplicas para 10^0 cópias (Figura 11). Considerando os três operadores, a média obtida para a temperatura de *melting* foi de $83,27^\circ\text{C}$ ($82,62^\circ\text{C}$ a $83,65^\circ\text{C}$). Pela curva padrão obteve-se uma média de 0,99 para o R^2 (0,97 a 0,99) e uma eficiência média de 97,26% (93,39 a 102,23).

Figura 11 – Sensibilidade analítica realizado para a PCR em tempo real *in house*. A) Curva de amplificação com indicação do número de cópias para cada ponto da curva de calibração. B) Curva padrão obtida com um R^2 de 0,99 e uma eficiência de 93,39%. Na reta estão sinalizados os números de cópias e as respectivas médias dos Ct para cada ponto.

4.4.2 Especificidade Analítica

A partir do material genético obtido das bactérias *Streptococcus uberis*, *Lactobacillus sakei*, *Clostridium perfringens* e *Acholeplasma laidlawii* (ATCC[®] 23206[™]) foram realizadas cinco diluições para cada amostra para titulação das mesmas. A concentração de cada ponto encontra-se na tabela 5.

Tabela 5 – Amostras constituintes do teste de especificidade analítica. Concentração do material genético (DNA) das bactérias em cada ponto das curvas de diluições.

PONTOS DA CURVA	CONCENTRAÇÃO DE DNA NAS AMOSTRAS E RÉPLICAS AMPLIFICADAS							
	<i>Streptococcus</i> <i>uberis</i>		<i>Lactobacillus</i> <i>sakei</i>		<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>		<i>Acholeplasma</i> <i>laidlawii</i>	
	(ng/μL)		(ng/μL)		(ng/μL)		(ng/μL)	
1	156,36	(8/8)	50,00	(8/8)	213,20	(8/8)	0,56	(3/3)
2	15,64	(8/8)	5,00	(8/8)	21,32	(8/8)	0,056	(3/3)
3	1,56	(4/8)	0,50	(0/8)	2,13	(8/8)	5,6 x 10 ⁻³	(2/3)
4	0,16	(0/8)	0,05	(0/8)	0,21	(8/8)	5,6 x 10 ⁻⁴	(0/3)
5	0,02	(0/8)	0,005	(0/8)	0,02	(8/8)	5,6 x 10 ⁻⁵	(0/3)

Entre parênteses estão os números de réplicas amplificadas. Para *Streptococcus uberis*, *Lactobacillus sakei* e *Clostridium perfringens* foram realizadas oito réplicas para cada diluição (definidas como pontos da curvas). Para *Acholeplasma laidlawii* foram realizadas três réplicas para cada diluição.

Os resultados obtidos pela PCR em tempo real *in house* (Apêndice I) mostraram amplificação do material genético das três bactérias consideradas. Para *Streptococcus uberis*, *Lactobacillus sakei* e *Clostridium perfringens*, as temperaturas de *melting* permaneceram respectivamente nos intervalos de 81,79 a 83,40°C; 85,46 a 86,63°C; e 84,43 a 85,46°C. Os resultados das réplicas amplificadas estão apresentados na tabela 5. Os testes realizados (em triplicata) para *Acholeplasma laidlawii* concomitantemente aos testes das bactérias citadas, apresentaram temperatura de *melting* no intervalo de 83,14 a 83,97°C.

A especificidade analítica também verificada com 50 amostras de DNA de células eucarióticas evidenciou amplificação de todas as amostras, com as temperaturas de *melting* dentro do intervalo considerado positivo (81 a 84°C). Os ciclos de amplificação variaram de 11 a 36 (Apêndice II).

Os produtos amplificados das bactérias e das amostras de DNA de células eucarióticas foram sequenciados. As sequências de nucleotídeos obtidas para as bactérias indicaram 99% de identidade com *Streptococcus uberis*, *Lactobacillus sakei*, *Clostridium perfringens*. Dentre as amostras de DNA de células eucarióticas, 74% (n=37) apresentaram uma média de 98% de identidade com o cromossomo 15 de *Homo sapiens*, 22% (n=11) mostrou 99% de identidade com *Mycoplasma hyorhinitis* e 4% (n=2) não apresentaram similaridade.

4.4.3 Sensibilidade Diagnóstica

Amostras positivas foram avaliadas em triplicata pela PCR em tempo real *in house* e apresentaram a média de 82,58°C (81,53 a 83,76°C) para temperatura de *melting* e de Ct de 22 (11 a 35). O critério de aceitação deste parâmetro foi uma reação positiva entre as réplicas. Todas as amostras apresentaram amplificação de pelo menos uma das réplicas: 65 amostras amplificaram as três réplicas; três amostras, duas réplicas e duas amostras amplificaram somente uma das réplicas. Assim, a sensibilidade diagnóstica foi determinada como 100%.

4.4.4 Potencial de Arraste

As reações com a amostra positiva (controle positivo) apresentaram a média de 81,94°C (81,65 a 82,34°C) para temperatura de *melting* e de 15 (14 a 19) para o ciclo de amplificação. Os resultados obtidos, tanto para as reações da amostra positiva como da amostra negativa, foram compatíveis com as suas respectivas qualificações. Nenhuma contaminação por arraste foi identificada, uma vez que não houve amplificação para as reações da amostra negativa.

4.4.5 Precisão

Os valores de Ct obtidos para o controle positivo com 10^3 cópias no intra e inter-ensaios estão descritos na tabela 6. As médias dos Ct obtidas foram, respectivamente, 26,5 e 26,3. O desvio padrão encontrado foi 0,17 e 0,47 e o coeficiente de variação 0,64% e 1,80% para o intra-ensaio (repetibilidade) e inter-ensaio, respectivamente.

Tabela 6 – Valores de Ct obtidos na avaliação da precisão da PCR em tempo real *in house*.

RÉPLICAS (10^3 cópias)	PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i>	
	Valor de Ct	
	Intra-ensaio	Inter-ensaio
1	26,58	26,18
2	26,36	25,85
3	26,50	25,94
4	26,33	25,87
5	26,30	27,18
6	26,59	26,21
7	26,46	26,94
8	26,86	26,54

4.4.6 Robustez

Os valores de Ct obtidos para o controle positivo com 10^4 cópias durante a análise de robustez estão descritos na tabela 7. A média dos Ct obtida foi 21,4. O desvio padrão e o coeficiente de variação foram de 1,16 e 5,42%, respectivamente.

Tabela 7 – Valores de Ct obtidos na avaliação da robustez da PCR em tempo real *in house*.

RÉPLICAS (10^4 cópias)	PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i>
	Valor de Ct
1	22,81
2	22,53
3	20,32
4	19,98
5	20,29
6	22,12
7	22,65
8	20,42

4.5 Plataforma Molecular *in house* e Teste Comercial *MycoAlert*[®]

Os resultados obtidos, para as 134 amostras avaliadas pelos dois métodos, foram comparados quanto à concordância entre si e classificados em negativo, inconclusivo e positivo (Apêndice III). A tabela 8 apresenta o número de amostras pertencentes a cada grupo.

Tabela 8 – Agrupamento dos resultados obtidos pelos dois métodos evidenciando a concordância e discordância entre os mesmos.

TESTE COMERCIAL <i>MYCOALERT</i> [®]	PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i>			
Número de Amostras	Número de Amostras			
	Negativo	Inconclusivo	Positivo	TOTAL
Negativo	44	2	40	86
Inconclusivo	-	-	1	1
Positivo	-	-	47	47
TOTAL	44	2	88	n=134

Houve concordância em 68% (n=91) das amostras: 44 negativos e 47 positivos, em ambos os testes. Os resultados discordantes totalizaram 32% (n=43) das amostras, dentre os quais estão 40 amostras com resultado falso-negativo pelo teste *MycoAlert*[®]. Não foi observado resultado falso-negativo (negativo pela plataforma molecular e positivo pelo *MycoAlert*[®]) pela PCR em tempo real *in house*.

A partir desses dados, foram selecionadas três amostras: 132 (ONS-76), 133 (HEK 293) e 134 (SK-HEP-1), para realizar a curva de sensibilidade (Apêndice III). Foram encontrados resultados positivos para os dois métodos e a análise por sequenciamento de DNA evidenciou 99% de identidade com *Mycoplasma hyorhinis*, para todas as amostras. Os resultados obtidos para essa curva estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Curva de sensibilidade com as amostras ONS-76, HEK 293 e SK-HEP-1 pelos testes *MycoAlert*[®] e plataforma molecular.

PONTOS DA CURVA*	TESTE COMERCIAL MYCOALERT [®]			PCR EM TEMPO REAL IN HOUSE		
	Razão: B/A			Valor de Ct		
	ONS-76	HEK 293	SK-HEP-1	ONS-76	HEK 293	SK-HEP-1
P ₁	20,11	261,64	120,45	14	11	12
P ₂	6,97	30,46	11,56	16	13	14
P ₃	1,06	10,40	2,98	18	15	16
P ₄	0,38	1,79	0,98	21	17	18
P ₅	0,18	0,19	0,17	23	19	20
P ₆	0,15	0,12	0,12	25	21	22
P ₇	0,13	0,10	0,13	27	24	24
P ₈	0,11	0,12	0,17	31	26	27
P ₉	0,12	0,13	0,15	S/A	28	29
P ₁₀	0,13	0,20	0,09	S/A	30	31

S/A: Sem amplificação.

B/A: Resultado do teste *MycoAlert*[®] definido pela razão das leituras A e B de luminescência. Valores de referência do teste comercial Mycoalert: < 0,9 = negativo; 0,9 - 1,2 = inconclusivo; > 1,2 = positivo.

*: Diluições da amostras na razão 5.

Para cada amostra, em destaque por caixas, estão os valores de transição entre negativo, inconclusivo e positivo do teste comercial. Caixas com cores iguais por amostra sinalizam o Ct correspondente.

A análise dos dados para o teste comercial *Mycolaert* (tabela 9) demonstro que a amostra ONS-76 apresentou para o ponto P₂ resultado positivo (Ct=16), para o ponto P₃ resultado inconclusivo (Ct=18) e para P₄ resultado negativo (Ct=21). Para a amostra HEK 293, o ponto P₄ foi positivo (Ct=17) e P₅ negativo (Ct=19). A amostra SK-HEP-1 apresentou nos pontos P₃, P₄ e P₅ resultados positivo (Ct=16), inconclusivo (Ct=18) e negativo (Ct=20), respectivamente.

O número de cópias presente em cada um dos pontos citados acima foi calculado pela equação da reta $y = -1,54\ln(x) + 36,67$, onde y é o valor de Ct e $R^2 = 0,997$. Os resultados obtidos estão representados na figura 12.

Figura 12 – Curvas de Regressão Linear e o número de cópias presente em cada ponto da curva de sensibilidade das amostras ONS-76, HEK 293 e SK-HEP-1. Cálculo realizado utilizando a equação da reta ($y = -1,54\ln(x) + 36,67$) obtida no teste de sensibilidade analítica. Eixo x dos gráficos em escala logarítmica na base 10. Ct: cycle threshold; P₁ a P₁₀: Diluições definidos como pontos da curvas.

Ao analisar a figura 12 e considerando os pontos P₂ (Ct=16) para ONS-76, P₄ (Ct=17) para HEK 293 e P₃ (Ct=16) para SK-HEP-1 como os pontos de cada curva com resultados positivos pelo teste comercial, pode-se observar que o menor número de cópias detectável por esse teste foi $3,5 \times 10^5$ cópias (P₄ da amostra HEK 293). Considerando os pontos de cada curva com resultados negativos pelo *MycoAlert*[®] os pontos P₄ (Ct=21) para ONS-76, P₅ (Ct=19) para HEK 293 e P₅ (Ct=20) para SK-HEP-1, tem-se que o ponto com maior número de cópias não detectável foi P₅ para HEK 293 ($9,6 \times 10^4$ cópias). Por essas análises, em relação a essas amostras, definiu-se que: i) o limite de detecção para o teste comercial foi de $3,5 \times 10^5$ cópias/5µL; ii) no intervalo entre $9,6 \times 10^4$ e $3,5 \times 10^5$ cópias (em 5 µL de amostra) encontram-se os resultados inconclusivos (P₃ e P₄ das amostras ONS-76 e SK-HEP-1, respectivamente); iii) as amostras com número de cópias menor do que $9,6 \times 10^4$ (em 5 µL de amostra) foram negativas pelo teste comercial. Ainda, foi possível observar que a detecção do material genético pela PCR em tempo real *in house* ocorreu para as amostras ONS-76 e SK-HEP-1 com até 40 cópias (5 µL) e para a amostra HEK 293 com até 76 cópias (5 µL). Assim, os resultados indicam que os limites de detecção da PCR convencional e em tempo real *in house* foram, respectivamente, 35.000 e 70.000 vezes maior que o limite de detecção do teste comercial.

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram selecionadas amostras previamente avaliadas pela plataforma molecular: uma amostra negativa (MSC-TA), uma positiva com amplificação tardia (MSC-MO) e uma positiva com valor de Ct abaixo de 20 (HEK 293). A caracterização e imagem destas amostras estão apresentadas na tabela 10 e figura 13.

Tabela 10 – Caracterização das amostras utilizadas para a microscopia eletrônica de varredura.

AMOSTRA	MYCOALERT [®]	PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i>		SEQUENCIAMENTO
	Razão=B/A	DNA de Concentrado Celular (Valor de Ct)	DNA de Sobrenadante (Valor de Ct)	BLAST
MSC-TA	0,21	S/A	S/A	NR
MSC-MO	0,62	31	S/A	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
HEK 293	38,84	11	15	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>

S/A: Sem amplificação.

NR: Não realizado.

B/A: Resultado do teste *MycoAlert*[®] definido pela razão das leituras A e B de luminescência.

Valores de referência do teste comercial: < 0,9 = negativo; 0,9 - 1,2 = inconclusivo; > 1,2 = positivo.

Figura 13 – Microscopia Eletrônica de Varredura. As setas vermelhas indicam as estruturas que sugerem o microrganismo *Mycoplasma* spp. Na imagem da célula MSC-TA (amostra negativa) observa-se uma superfície mais lisa. Na imagem da célula MSC-MO (positiva com Ct=31) nota-se uma superfície com estruturas que sugerem *Mycoplasma* spp. aderidos à superfície. A célula HEK 293 (positiva com Ct=11) possui estruturas semelhantes por toda a sua superfície. As imagens estão com aumento de 10.000X e escala de 1 µm.

Ao analisar as imagens, a célula MSC-TA (amostra negativa) apresenta-se com filamentos celulares em suas bordas, porém com uma superfície lisa, aparentemente livre de microrganismos. Nas células MSC-MO (positiva com Ct=31) e HEK 293 (positiva com Ct=11) é possível observar estruturas aderidas à superfície celular, tornando-a irregular. Estas estruturas, as quais sugerem *Mycoplasma* spp., apresentam-se em maior quantidade na célula HEK 293 do que na MSC-MO quando comparadas em imagens de menor aumento (Figura 14).

Figura 14 – Microscopia Eletrônica de Varredura Comparativa entre MSC-MO e HEK 293. Comparação entre a quantidade de estruturas presentes na superfície das células MSC-MO (positiva Ct=31) e HEK 293 (positiva Ct=11). **MSC-MO:** seta vermelha indica a região da imagem mostrada na figura 13; aumento de 1.000X e escala de 10 µm. **HEK 293:** setas vermelhas indicam as estruturas sugestivas de *Mycoplasma* spp. por toda a sua superfície celular; aumento de 5.000X e escala de 5 µm.

4.7 Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada com as sequências de nucleotídeos obtidas das amostras positivas (Apêndice III) comparando-as com os genomas de referência obtidos pelo banco de dados *GenBank*. As sequências obtidas (n=101) foram alinhadas e agrupadas pelo programa *BioEdit* de acordo com a similaridade. Esta análise resultou em seis grupos distintos que receberam a denominação dos respectivos números de acesso no banco de dados *GenBank*. Os seis grupos foram: grupo 1 (NR_074448.1), grupo 2 (JN543265.1), grupo 3 (AY920083.1), grupo 4 (JQ940979.1), grupo 5 (JQ903580.1) e grupo 6 (AF258794.1). Inicialmente, o teste *Permutation Tail Probability* (P=0.00001) mostrou que o alinhamento apresenta um bom sinal filogenético permitindo a reconstrução de uma árvore filogenética verdadeira. Na árvore filogenética ocorreu uma nítida separação do *outgroup* (*Clostridium innocum*, *Clostridium ramosum*, *Lactobacillus vitulinus*, *Lactobacillus plantarum*, *Yersinia pestis* e *Escherichia coli*) com as demais sequências analisadas (*Mycoplasma* spp., *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma* spp., *Ureaplasma* spp. e os seis grupos das sequências obtidas neste estudo), como pode ser observado na figura 15. As cepas de referência de *Mycoplasma* spp., *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma* spp., *Ureaplasma* spp. e as sequências analisadas separaram-se em dois *clusters* (*cluster* 1 e 2). Todas as sequências analisadas (*group* 1, 2, 3, 4, 5 e 6, figura 15) distribuíram-se no *cluster* 2, que por sua vez mostrou formação de três *subclusters* (*subclusters* 1, 2 e 3). Os grupos 1, 2, 3 e 4 formaram o *subcluster* 1 juntamente com a espécie *Acholeplasma laidlawii*, sendo então estes grupos identificados como tal espécie (*bootstrap*, 100%). Os grupos 5 e 6 se localizaram no *subcluster* 3, no qual o grupo 5 formou um ramo com *Mycoplasma arginini* e o grupo 6 *Mycoplasma hyorhinis*.

Figura 15 – Árvore filogenética evidenciando a separação do *outgroup* e a formação dos clusters. **Clusters 1 e 2:** separação das cepas de referência de *Mycoplasma* spp., *Acholeplasma laidlawii*, *Spiroplasma* spp., *Ureaplasma* spp. e das seqüências analisadas em dois clusters. **Subcluster 1 e 3:** localização dos grupos 1, 2, 3 e 4 no subcluster 1 com *Acholeplasma laidlawii* e dos grupos 5 e 6 no subcluster 3, formando ramos com *M. arginini* e *M. hyorhinis*, respectivamente.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O cultivo de células humanas para fins experimentais e terapêuticos se firmou como um dos pilares da biologia celular e tem se tornado uma prática laboratorial cada vez mais disseminada. Entre os diversos aspectos operacionais associados ao processo de cultivo celular está a contaminação por microrganismos, dentre os quais se destaca o gênero *Mycoplasma* spp. (DREXLER; UPHOFF, 2002). Apesar de ser considerado um importante requisito regulatório para a garantia da qualidade, pureza e segurança das células e de seus produtos, a detecção precoce e eficaz da contaminação de culturas por esse microrganismo apresenta limitações. O método microbiológico, considerado padrão-ouro e estabelecido há décadas atrás, é ainda empregado para a detecção do *Mycoplasma* spp., porém é laborioso e de longa duração (em média 28 dias) (DEUTSCHMANN; KAVERMANN; KNACK, 2010). Isto inviabiliza o uso desse método como teste de rotina nos processos de cultivo celular, bem como a tomada de decisão rápida para avanço no cultivo após a coleta do material e o monitoramento de células com curto tempo de prateleira (*shelf-life*) (PEREDELTCOUK et al., 2010).

Inúmeros kits comerciais para detecção de *Mycoplasma* spp., que vão desde os testes imunológicos até os moleculares, estão disponíveis no mercado. No entanto, muitos apresentam alto custo, limites de detecção variáveis, número restrito de espécies detectadas e necessidade de equipamentos específicos para sua realização. Dentre as metodologias disponíveis, os testes que detectam os ácidos nucleicos (do inglês, *Nucleic Acid Testing* - NAT) são os mais promissores para uma detecção simples e rápida de *Mycoplasma* spp., com sensibilidade analítica satisfatória e custo viável (DABRAZHNETSKAYA et al., 2013). Os primeiros artigos sobre a aplicação da PCR para detecção de *Mycoplasma* spp. datam de 1989, quando grande parte das sequências do gene 16S rDNA foram determinadas e formaram as bases para a análise filogenética sistemática (WEISBURG et al., 1989). Desde então, há uma busca constante pelo desenvolvimento de testes moleculares que atendam as necessidades das mais diversas aplicações.

Vários métodos de PCR convencional foram descritos para uma rápida detecção de *Mycoplasma* spp. (HARASAWA et al., 1993; DUSSURGET; ROULLAND-DUSSOIX, 1994; WIRTH et al., 1994; TANG et al., 2000) e comparados favoravelmente com outros testes em termos de simplicidade e confiabilidade (van KUPPEVELD et al., 1994; HU et al., 1995; RAWADI; DUSSURGET, 1995; UPHOFF; DREXLER, 2002). Contudo, as reações de PCR em tempo real são mais sensíveis que as reações de *end-point*, uma vez que os dados são obtidos na fase exponencial, quando os componentes da reação não estão limitados. Além

disto, a reação ocorre em um só passo, o que evita processos pós-PCR, reduzindo a possibilidade de contaminação. Nas últimas décadas, inúmeros ensaios baseados na técnica de PCR em tempo real foram desenvolvidos para detecção de patógenos como bactérias e vírus (HARDEGGER et al., 2000; JAUREGUI et al., 2001; TAJIMA et al., 2001; BELL et al., 2002; BACZYNSKA et al., 2004).

A fim de estabelecer uma plataforma molecular para detecção de espécies de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares, foram avaliadas, além do gene 16S rDNA, regiões relacionadas à identidade dos microrganismos de interesse (espécies de *Mycoplasma* spp., *Acholeplasma laidlawii*, *Ureaplasma urealyticum* e *Spiroplasma citri*). Dentre estas, o espaço intergênico 16S/23S rDNA, o gene *tuf* (fator de elongação EF-Tu) e o gene *hsp70* (proteína de choque térmico) foram estudados como regiões alvo candidatas ao PCR em tempo real. No entanto, estas regiões são consideradas como marcadores filogenéticos adicionais para complementar as informações obtidas a partir do gene 16S rDNA (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Além disso, estudos computacionais de alinhamento para o gene 16S rDNA demonstraram a existência de regiões altamente conservadas e também regiões variáveis delimitadas que permitem distinguir em níveis de espécie, gênero ou classe. Assim, a presença da região conservada possibilita a seleção de oligonucleotídeos para a detecção de espécies distintas de *Mycoplasma* spp. (RAWADI; DUSSURGET, 1995). A importância do gene 16S rDNA para a filogenia, a taxonomia e a identificação de espécies de *Mycoplasma* spp., levou o Subcomitê para Taxonomia de *Mollicutes* (ICSP - *International Committee on Systematics of Prokaryotes*) a recomendar a inclusão deste gene em todas as descrições de novas espécies para esta classe.

Diante deste panorama, o desenho dos *primers* utilizados neste trabalho foi realizado para o gene 16S rDNA, com o intuito de obter um teste mais sensível (PCR em tempo real) com um único conjunto de *primers*, e capaz de detectar o maior número de espécies (n=18) dentre as de maior relevância e frequência em culturas celulares. Na literatura, é possível encontrar inúmeros trabalhos relacionados ao estabelecimento de PCR para a detecção de *Mycoplasma* spp. em culturas celulares, infecções humanas, animais e vegetais. A maioria desses artigos traz ensaios que utilizam PCR convencional (menor sensibilidade), conjunto de *primers* para espécie específica ou reações com vários conjuntos de *primers* (*multiplex*). Poucos trabalhos relatam o uso de PCR em tempo real, dentre eles: i) Ursi et al. (2003) e Pitcher et al. (2006), descreveram a detecção de *Mycoplasma pneumoniae* (espécie única) em amostras respiratórias; ii) Clothier et al. (2010) e Pascual et al. (2010) relataram novos testes para *Mycoplasma bovis* e *Mycoplasma hominis* (espécie única); iii) Ishikawa et al. (2006),

publicaram um protocolo baseado no uso SYBR[®] Green para detecção de oito espécies de *Mycoplasma* spp. por meio do uso de *primers multiplex*; e iv) Janetzko et al. (2014), descreveram um ensaio para detecção de 18 espécies de *Mycoplasma* spp. como um controle de qualidade de rotina em células terapêuticas, utilizando sete diferentes *primers forward*, um *primer reverse* e uma sonda (*multiplex primer*).

A análise do alinhamento múltiplo das sequências permitiu a elaboração de diversos conjuntos de *primers* (Figura 4, seção resultados). Os oligonucleotídeos desenhados nessa dissertação apresentaram resultados insatisfatórios quando comparados ao conjunto de *primers* descritos por van Kuppeveld et al. (1992). A formação de dímeros de *primers* em reações controle sem *template* (NTC) e a não amplificação de amostras positivas na PCR convencional inviabilizaram o uso dos oligonucleotídeos desenhados. O conjunto selecionado para a plataforma molecular foram os *primers forward* 4 (GPO-3) e o *reverse* 2 (MGSO). O primeiro é um oligonucleotídeo de procariotos em geral, enquanto o segundo está localizado na única região que pode ser caracterizada como potencialmente gênero-específico para *Mycoplasma*. A sequência da região do *primer reverse* 2 não é absolutamente conservada para todas as espécies de *Mycoplasma* spp. e a maioria delas apresenta variabilidade de um ou dois nucleotídeos, mas algumas espécies apresentam variações de quatro a seis. Essas variações estão localizadas na porção central do oligonucleotídeo, o que teoricamente não influencia significativamente na amplificação, diferentemente de *mismatches* localizados no final 3' de *primers* que reduzem fortemente a amplificação (van KUPPEVELD et al., 1992). Assim, a análise computacional dos *primers forward* 4/*reverse* 2 e, conseqüentemente a confirmação dessas informações, indicaram estes *primers* como os mais adequados para este estudo, levando a seleção dos mesmos.

Ao otimizar a PCR em tempo real *in house* com o conjunto de *primer* selecionado, o intervalo estabelecido para a temperatura de *melting* (T_m) apresentou uma variação de 3°C (81 a 84°C). Resultado semelhante foi observado no trabalho de Ishikawa et al. (2006) realizado para a detecção de oito espécies, no qual os picos de T_m permaneceram entre 80,5 e 82°C. A variação de temperatura pode ser explicada pela composição de nucleotídeos nas sequências das diferentes espécies. As sequências com maior conteúdo de GC apresentam um acréscimo na T_m devido ao maior número de ligações de hidrogênio entre essas duas bases nitrogenadas. Corroborando com esse conceito, as T_m obtidas em ensaios intra-espécies apresentaram variações de décimos de graus Celsius, como por exemplo, as temperaturas para o controle positivo (sequência da espécie *Acholeplasma laidlawii*) que apresentaram resultados entre 83,1 e 83,6°C. Pode-se observar ainda, que a ocorrência de T_m fora do

intervalo estabelecido para as amostras positivas foram decorrentes da formação de dímeros de *primers*, pois ao analisar os produtos de PCR dessas amostras por eletroforese em gel de agarose não houve visualização de bandas, indicando a ausência de amplificação.

A fim de definir o tipo de amostra que fornecesse o material genético bacteriano mais adequado para sua detecção pela PCR em tempo real *in house*, foram avaliados tanto o sobrenadante quanto o concentrado celular. O uso do sobrenadante como amostra foi proposto pelas seguintes razões: é uma amostra de fácil obtenção, uma vez que este material geralmente é descartado; permite detectar precocemente a contaminação devido a possibilidade de realizar a análise com maior frequência (a cada troca de meio); não interfere no número final das células cultivadas e, em casos de células aderentes, a obtenção da amostra não fica restrita ao momento da tripsinização das células. Uma desvantagem do sobrenadante é que o seu volume total é grande (15 mL), enquanto o volume utilizado para a extração do DNA é muito pequeno (200 µL). Isso ocasiona, em casos em que há baixa carga bacteriana, a obtenção de uma amostra muito diluída, limitando a recuperação do material genético bacteriano e consequentemente levando a um resultado falso-negativo devido ao limite de detecção do teste. Por outro lado, acredita-se que o uso do concentrado celular minimizaria este problema, uma vez que a célula cultivada é a principal localização dos *Mycoplasmas* spp.. Assim, o concentrado celular seria uma amostra com maior concentração do microrganismo, gerando um resultado mais fidedigno e reduzindo a ocorrência de falso-negativos.

Para validar os resultados obtidos por um determinado teste diagnóstico é necessário a utilização de reações controles no procedimento analítico. A construção do controle positivo plasmidial a partir do DNA genômico de *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™) objetivou a obtenção de um controle padrão e caracterizado, passível de produção e estocagem e que dispensasse o manuseio do *Mycoplasma* spp., evitando assim o risco de uma eventual propagação. Ao realizar a PCR convencional com o controle positivo, observou-se a não amplificação do mesmo devido à formação de *supercoil* no DNA plasmidial, o qual consiste em um enrolamento extra da molécula circular de DNA. Para solucionar este problema, o controle positivo foi linearizado, uma vez que o rompimento na cadeia de DNA é capaz de desfazer o *supercoil*.

A caracterização do controle positivo e em paralelo do DNA genômico *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™), por meio do sequenciamento, evidenciou cinco nucleotídeos discordantes na região do *primer reverse 2* (Figura 9, seção resultados). No entanto, a sequência obtida representava exatamente a sequência reversa complementar ao *primer reverse 2*

(figura 4, seção resultados). Isto indica que o *primer reverse 2* alterou a sequência original do DNA genômico nos produtos amplificados, no momento do pareamento entre ambos. Assim, é possível inferir que a discordância encontrada na região deste *primer* foi um artefato e que provavelmente a amostra de DNA genômico *Acholeplasma laidlawii* (ATCC® 23206™) apresentou 100% de identidade com a sequência de referência do alinhamento (Figura 9, seção resultados). Outras discordâncias verificadas na sequência do DNA genômico podem ser atribuídas às inserções erradas de nucleotídeos pela enzima, uma vez que para esta amostra a reação de amplificação não foi realizada com a enzima polimerase de alta fidelidade.

Com a PCR em tempo real *in house* padronizada, foi iniciado o processo de validação do teste, o qual tem como função indicar, qualitativa e quantitativamente, a sua utilidade em diagnosticar um evento ou predizê-lo. Para validar o método foram avaliados os seguintes parâmetros: sensibilidade analítica e diagnóstica, especificidade analítica, potencial de arraste, precisão e robustez.

A sensibilidade analítica foi realizada tanto para a PCR convencional *in house* quanto para em tempo real *in house*, a fim de avaliar o possível ganho na sensibilidade da segunda em relação à primeira. É importante salientar que os resultados obtidos nessa análise foram em relação à espécie *Acholeplasma laidlawii*. O teste de sensibilidade da PCR convencional *in house*, apresentou uma amplitude significativa de 125,46 para o intervalo de *Probit* (16,97 a 142,43). Isso ocorreu em virtude do resultado obtido por um dos operadores, com detecção de 6 réplicas no ponto 10^1 cópias, enquanto que para os demais operadores nenhuma réplica foi detectada neste mesmo ponto. Por sua vez, a PCR em tempo real *in house* apresentou uma amplitude de 0,51 no intervalo de *Probit* (5,26 a 5,77), uma vez que os três operadores detectaram de 2 a 4 réplicas no ponto 10^0 cópias. Esses resultados indicam que a PCR em tempo real apresentou uma maior reprodutibilidade quando comparada a PCR convencional. Assim, tem-se que o limite de detecção (*Limit of Detection* - LOD) da PCR em tempo real *in house* (5 cópias/5 μ L) é 20 vezes maior do que o LOD da PCR convencional *in house* (100 cópias/5 μ L). É possível encontrar na literatura valores semelhantes, para a PCR em tempo real com sondas de hidrólise: Pitcher et al. (2006) relataram um limite de detecção de 10 cópias/5 μ L para a espécie *Mycoplasma pneumoniae*; Pascual et al. (2010) descreveram um LOD de 10 cópias/20 μ L para detecção de *Mycoplasma hominis*; Janetzko et al. (2014) obtiveram de uma maneira geral, um limite de detecção inferior a 1000 genomas/mL. Sabe-se que são diversos os fatores que influenciam no limite de detecção de um teste molecular, dentre eles a composição nucleotídica da amostra, o tamanho e a composição dos primers, o

tamanho do fragmento amplificado e reação *multiplex primers*. A pequena variação encontrada entre os trabalhos descritos e o esse estudo pode ser justificada por alguns desses fatores. Contudo, não é claro se os valores obtidos para os limites de detecção tanto da PCR convencional *in house* quanto da PCR em tempo real *in house*, estão em acordo com o valor requerido pela Farmacopéia Européia (10 CFU/mL), uma vez que não está definida a relação entre uma unidade formadora de colônia (CFU) e número de cópias do genoma (JANETZKO et al., 2014).

A especificidade analítica evidenciou reação cruzada dos *primers* com o DNA das três bactérias de relação filogenética próxima (*Streptococcus uberis*, *Lactobacillus sakei*, *Clostridium perfringens*) e das células eucarióticas humanas. O intervalo de T_m para as espécies *Lactobacillus sakei* (85,5 a 86,6°C) e *Clostridium perfringens* (84,4 a 85,5°C) foi acima do intervalo definido para as amostras positivas (81 a 84°C). No entanto, não é possível afirmar que o mesmo ocorra para outras espécies desses gêneros. Como discutido anteriormente, a composição de nucleotídeos da sequência de DNA influencia na T_m , podendo haver temperaturas distintas entre espécies do mesmo gênero. Para *Streptococcus uberis* (81,8 a 83,4°C) e DNA de célula eucariótica humana (80,5 a 82,1°C; cromossomo 15 de *Homo sapiens*), as temperaturas de *melting* obtidas encontram-se no intervalo das amostras positivas (81 a 84°C), o que impediu a distinção entre *Streptococcus uberis*, DNA humano e *Mycoplasma* spp.. Foi observado também que a PCR em tempo real *in house* foi capaz de detectar menores concentrações do DNA de *Acholeplasma laidlawii* ($5,6 \times 10^{-3}$ ng/ μ L) quando comparada a detecção de *Streptococcus uberis* (até 1,5 ng/ μ L), *Lactobacillus sakei* (até 5,0 ng/ μ L) e *Clostridium perfringens* (até 0,02 ng/ μ L), indicando maior complementariedade dos *primers* ao material genético de *Acholeplasma laidlawii*. Na reação cruzada com o DNA de células humanas, as amostras amplificadas com valores altos de Ct (28 a 35) foram identificadas como cromossomo 15 de DNA humano, enquanto que as amostras de concentrado celular contaminadas com alta carga bacteriana (Ct de 11 a 16) foram confirmadas como 16S rDNA de *Mycoplasma hyorhinis*. Três amostras apresentaram elevado valor de Ct (27, 28 e 31) com amplificação do 16S rDNA (Apêndice III). Esses dados indicam que houve uma competição entre o material genético do *Mycoplasma* spp. e da célula eucariótica humana pelos *primers*. Considerando os resultados obtidos na avaliação da especificidade analítica, justifica-se, para o emprego do método utilizado nessa dissertação, a exclusão do concentrado celular como amostra e a necessidade de sequenciamento das amostras positivas para discriminar os microrganismos relacionados. Contudo, a relevância do uso do concentrado celular como amostra permanece, uma vez que foi observado um

resultado falso-negativo para uma amostra de sobrenadante (MSC-MO, tabela 10) quando comparado ao seu concentrado celular. É importante salientar que, dentre todas as amostras de DNA de sobrenadante avaliadas pela PCR em tempo real *in house*, positivas e sequenciadas, não foi observada a ocorrência de resultados falso-positivos.

Segundo van Kuppeveld et al. (1992), autores dos *primers* utilizados nessa plataforma molecular, o alinhamento da sequência reversa complementar do *primer reverse 2* com sequências de procariotos e eucariotos, apresentaram múltiplos *mismatches* na região 3' do complementar; e os alinhamentos demonstraram que *Streptococcus pleomorphus* e *Eubacterium biforme* foram as únicas espécies de não molícutes com homologia significativa ao reverso complementar do *primer reverse 2*. Assim, as análises *in silico* demonstraram ser pouco provável a ocorrência de reação cruzada com material genético de outras espécies. Diferentemente do que foi observado nesse estudo, os autores ainda relataram a não detecção do material genético de bactérias com relação filogenética próxima (*C. difficile*, *C. innocum*, *C. ramosum*, *L. acidophilus*, *L. fermentans*, *S. agalactiae*, *S. faecalis*, *B. subtilis*) quando submetidos à análise de PCR convencional.

Para a determinação da sensibilidade diagnóstica foram utilizadas somente amostras de DNA extraídas a partir de sobrenadante a fim de evitar reação cruzada com o DNA humano. Os resultados obtidos dos sequenciamentos dos produtos da PCR convencional *in house* foram considerados como referência para comparação dos resultados. Para esse parâmetro, a PCR em tempo real *in house* apresentou 100% de resultados verdadeiro-positivos. Para esta análise foram considerados como resultado positivo pela PCR em tempo real *in house* as amostras que amplificaram pelo menos uma das réplicas. O parâmetro especificidade diagnóstica, que visa mensurar resultados verdadeiramente negativos, não foi realizado devido à limitação de testes para padrão ouro. Como foi verificado, o limite de detecção da PCR em tempo real *in house* foi maior do que o limite de detecção da PCR convencional *in house* e do teste comercial *MycoAlert*[®] (4.4.1 e 4.5, seção resultados). Assim, amostras selecionadas com resultados negativos pela PCR convencional *in house* e pelo teste comercial *MycoAlert*[®], muitas vezes foram positivas (confirmadas por sequenciamento) pela PCR em tempo real *in house*. Isso dificultou a obtenção de amostras verdadeiramente negativas.

Ao avaliar o potencial de arraste da plataforma molecular, não foi constatada amplificação de amostras negativas. A realização do procedimento de pipetagem, seguindo as orientações de boas práticas para execução de testes moleculares, proporcionou risco zero para o potencial de contaminação.

A precisão e robustez avaliaram a capacidade do teste em produzir resultados consistentes. Observou-se na análise da precisão que os testes realizados com uma determinada amostra sob as mesmas condições em uma única corrida, apresentaram maior repetibilidade quando comparados aos testes realizados com essa mesma amostra em momentos diferentes. Na robustez, foi observada maior variabilidade entre resultados de uma mesma amostra sob condições diferentes. Contudo, os coeficientes de variação obtidos para cada teste evidenciaram que variáveis como operador, lote de reagente e equipamento não foram capazes de influenciar significativamente no desempenho da reação (tabelas 7 e 8, seção resultados).

Após avaliação dos parâmetros pertinentes à validação da plataforma molecular, foi realizada a comparação dos resultados produzidos e do limite de detecção da PCR em tempo real *in house* com o do teste comercial *MycoAlert*[®]. A análise comparativa entre os resultados produzidos por ambos os testes mostrou que todas as amostras que foram positivas no teste comercial também foram positivas na PCR em tempo real *in house*. A maioria destas amostras, verdadeiro-positivas para ambos os testes, amplificaram com o valor de Ct abaixo de 20. Por sua vez, todas as amostras negativas na PCR em tempo real *in house* foram negativas no teste *MycoAlert*[®], isto é, verdadeiro-negativas para os dois testes. Verificou-se ainda que amostras negativas no teste comercial não necessariamente foram negativas na plataforma molecular. Em um total de 134 amostras, 40 amostras (29,85%) formaram o grupo das falso-negativas para o teste comercial. Além disso, a amostra inconclusiva para o teste comercial foi positiva para a PCR em tempo real *in house*, e as duas amostras que foram inconclusivas nesta última foram negativas no teste *MycoAlert*[®]. O teste comercial não detectou um total de 43 amostras, uma vez que as duas amostras inconclusivas pela PCR em tempo real *in house* foram assim consideradas devido ao resultado de seus sequenciamentos, *Uncultured bacterium* (bactérias que não foram isoladas em cultivo). Mas, a análise filogenética destas sequências evidenciou identidade destas amostras com a espécie *Acholeplasma laidlawii*, confirmando assim resultado positivo para as mesmas.

Analisando os resultados obtidos em ambos os testes para as amostras positivas percebe-se que de uma maneira em geral houve uma relação inversamente proporcional entre a razão obtida no teste comercial e o valor do Ct da PCR em tempo real *in house*. No entanto, as amostras 54 (R = 116,5; Ct = 13), 72 (R = 24,5; Ct = 11) e 78 (R = 36,8; Ct = 25) não obedeceram a essa relação. Esses dados podem ser explicados por erros aleatórios e sistemáticos, como homogeneização inadequada das amostras, pipetagem, tamanho da amostra e qualidade das amostras. Diante dos resultados e da não ocorrência de falso-

negativos para a plataforma molecular, é possível supor que a PCR em tempo real *in house* foi mais sensível do que o teste comercial. Para verificar essa suposição, o número de cópias detectável pelo teste *MycoAlert*[®] foi determinado por meio da equação da reta obtida para a curva padrão (10^5 a 10^0 cópias) no teste de sensibilidade analítica. As amostras utilizadas para essa análise (ONS-76, HEK 293 e SK-HEP-1) apresentaram variações significantes na carga bacteriana dos primeiros pontos da curva (P_1). Isso justifica a não amplificação dos últimos dois pontos (P_9 e P_{10}) para a amostra ONS-76, uma vez que essa amostra possuía um grau de contaminação inferior que o verificado nas demais amostras (com base nos resultados dos dois testes) ao verificado nas demais amostras. Em acordo com essa hipótese, todas as amostras amplificaram aproximadamente até o Ct 31. Assim, os pontos devem ser considerados somente para identificação das diluições e não para relacioná-los entre as amostras. Por meio da equação da reta, determinou-se que todas as amostras possuíam mais cópias do que o primeiro ponto da curva padrão (10^5 cópias); que para as amostras ONS-76, HEK 293 e SK-HEP-1 o limite de detecção do teste comercial foi 7×10^4 cópias/ μL , enquanto que para a PCR em tempo real *in house* foi 40 cópias/5 μL . Com base nesses achados foi possível identificar que os limites de detecção da PCR em tempo real e convencional *in house* foram respectivamente 70.000 vezes e 3.500 vezes maior do que o limite de detecção do teste comercial *MycoAlert*[®].

Uma metodologia útil para confirmar a presença de *Mycoplasma* spp. em células cultivadas é a microscopia eletrônica de varredura. Com o intuito de complementar os dados obtidos até então, a microscopia de varredura foi realizada para amostras com diferentes níveis de carga bacteriana verificados pela PCR em tempo real *in house*. As estruturas, sugestivas de *Mycoplasmas* spp., encontradas nas superfícies celulares foram semelhantes aos *Mycoplasma* spp. mostrados na literatura (RAWADI; DUSSURGET, 1995; UPHOFF; DREXLER, 2002). Além disto, as imagens corroboram com os resultados da PCR em tempo real *in house*, isto é, a amostra negativa MSC-TA apresenta sua superfície lisa, aparentemente livre de *Mycoplasma* spp.; a amostra MSC-MO, positiva com valor de Ct 31 (amplificação tardia indicando baixa carga bacteriana) possui sua superfície com poucas estruturas sugestivas de *Mycoplasma* spp.; enquanto que a amostra HEK 293, positiva com valor de Ct 11 (amplificação nos primeiros ciclos indicando alta carga bacteriana) apresenta incontáveis estruturas sugestivas de *Mycoplasma* spp. por toda a sua superfície. Desse modo, também foi possível validar a plataforma molecular por meio de imagens.

Na análise filogenética, o uso do *outgroup* permitiu obter uma árvore filogeneticamente confiável. Considerando o suporte estatístico usado, foi possível identificar

e confirmar *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini* e *Mycoplasma hyorhinae* como as espécies das sequências analisadas. As amostras identificadas no programa *BLAST* como *Uncultured bacterium* foram agrupadas com a espécie *Acholeplasma laidlawii*, o que permitiu identificá-las como tal e confirmar dois resultados inconclusivos da PCR em tempo real *in house* como positivos. Considerando todas as análises com resultados de sequenciamentos confirmatórios realizados, foi possível verificar que a espécie mais frequentes, dentre as amostras avaliadas, foi *Mycoplasma hyorhinae* (70%), seguido por *Acholeplasma laidlawii* (28%) e *Mycoplasma arginini* (2%). Esses dados condizem com a literatura (DREXLER; UPHOFF, 2002), na qual 90-95% dos contaminantes identificados em culturas celulares são *M. orale*, *M. hyorhinae*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis* e *Acholeplasma laidlawii*. Além disso, é descrito que quando há uma contaminação em um laboratório, a maioria das culturas positivas contém as mesmas espécies (MCGARRITY; KOTANI; BUTLER, 1992). *Mycoplasma hyorhinae* é encontrado principalmente na cavidade nasal de suínos, enquanto *Acholeplasma laidlawii* e *Mycoplasma arginini* possuem os bovinos como hospedeiro natural. No entanto, são inúmeros os exemplos de *Mycoplasma* spp. presentes em hospedeiros e tecidos diferentes de seus habitats normais (RAZIN, 1992).

Não se sabe ao certo a capacidade que estas espécies possuem de causar infecção em humanos. A ausência de investigação para estes microrganismos faz com que haja um subdiagnóstico tanto das infecções causadas por esses agentes quanto das espécies encontradas em humanos. Nos últimos anos, alguns trabalhos relataram os efeitos destes microrganismos em infecções humanas e em contaminações celulares. Yang et al. (2010) relacionou a infecção por *M. hyorhinae* em carcinoma gástrico e seu efeito indutivo no fenótipo das células cancerosas; Zinöcker et al. (2011) descreveu que células-tronco estromais infectadas por *M. hyorhinae* inibem a proliferação de linfócitos *in vitro*; Shchebliakov et al. (2008) identificaram que a infecção por *M. arginini* induz a ativação constitutiva de NF-kappaB e inibem apoptose em células expressando receptores tipo TLR2/6; Miller et al. (2009) evidenciaram mecanismos de interação entre o vírus do HIV e o *M. arginini* *in vitro*; Shimizu et al. (2004) mostraram a interação entre glicoglicerolípidos da membrana de *Acholeplasma laidlawii* com o HIV-1 acelerando a entrada deste nas células. Contudo, permanecem desconhecidos os efeitos da contaminação por *Mycoplasma* spp., *Acholeplasma laidlawii*, *Ureaplasma* spp. e *Spiroplasma* spp. em pacientes imunossuprimidos.

Com base nos resultados, e para minimizar os problemas encontrados com a aplicação da PCR em tempo real *in house*, foi proposto um algoritmo para aplicação da plataforma molecular desenvolvida neste trabalho (figura 16). Com intuito de obter uma amostra livre de

células e evitar reação cruzada com DNA humano, foi estabelecido o uso somente de sobrenadante como amostra e a sua centrifugação. Por sua vez, o processamento da amostra por meio de extração do DNA visou obter uma amostra mais concentrada e livre de inibidores da reação. Ficou definido ainda que as amostras com resultados positivos devem ser sequenciadas para confirmar a positividade para *Mycoplasma* spp., *Acholeplasma laidlawii*, *Ureaplasma urealyticum* e *Spiroplasma citri*, uma vez que o teste apresentou inespecificidade quando avaliado com bactérias de relação filogenética próxima.

Figura 16 – Algoritmo estabelecido para aplicação da plataforma molecular na rotina dos laboratórios de cultura de células.

Ao considerar essa análise como controle de qualidade para produto biológico a ser infundido em pacientes imunossuprimidos, a identificação de uma contaminação desqualifica a amostra para uso terapêutico, independentemente do microrganismo. Assim, deter uma metodologia *in house* que proporcione estabelecer um controle de qualidade às células destinadas tanto ao uso terapêutico quanto a pesquisa é primordial para atual realidade da medicina. A necessidade de haver uma rotina de testes para grandes quantidades de amostras inviabiliza a realização do teste microbiológico (padrão ouro). Por sua vez, o teste comercial *MycoAlert*[®] também é um teste indireto, apresenta baixa sensibilidade quando comparado as PCR convencional e em tempo real *in house*, e possui alto custo (aproximadamente

R\$39,00/amostra), quando comparado a plataforma molecular proposta (aproximadamente R\$26,50/amostra desde a extração até o sequenciamento).

Por fim, acredita-se que seja necessário aprimorar a plataforma molecular desenvolvida neste trabalho, visando estabelecer o uso de concentrado celular como amostra e eliminar a necessidade de sequenciamento das amostras positivas, reduzindo assim o custo e o tempo de sua execução. Em acordo com esta idéia, trabalhos apresentados no *20th Congress of the International Organization for Mycoplasma* (2014) evidenciaram a tendência do uso de métodos diagnósticos como testes moleculares para a detecção de *Mycoplasma* spp.. Acredita-se também que a necessidade de realizar o sequenciamento para as amostras positivas não representa uma completa desvantagem. Em uma reportagem recente publicada na revista *Nature* e intitulada “*Bring microbial sequencing to hospitals*”, Sharon Peacock (2014), professora de microbiologia na Universidade de Cambridge (Reino Unido), discorre sobre a importância de ter o sequenciamento como uma ferramenta complementar para diagnósticos microbiológicos. A rapidez e facilidade de identificação da espécie (ou espécies em casos de co-infecções) permitindo decisões rápidas em relação ao tratamento mais adequado (droga de escolha); a possibilidade de relacionar mutações com resistência a drogas, e as investigações genômicas retrospectivas para identificar origem da contaminação, rotas de transmissão e assim realizar intervenções no ponto correto, são alguns pontos evidenciados. Assim, o desenvolvimento tecnológico deve acompanhar, com a mesma rapidez, a evolução e o constante surgimento de novos microrganismos, a fim de fornecer diagnósticos mais completos.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- A PCR convencional e a PCR em tempo real *in house* com o conjunto de *primer* selecionado detecta, *in silico*, as 18 espécies proposta neste trabalho.
- Foi construído o controle positivo plasmidial que possui 100% de identidade com a sequência de referência (*Acholeplasma laidlawii*).
- O sobrenadante das culturas celulares foi estabelecido como amostra desta plataforma.
- Os parâmetros de validação obtidos foram satisfatórios, com exceção da especificidade analítica, que evidenciou amplificação cruzada e consequentemente, resultados falso-positivos.
- A PCR em tempo real *in house* foi mais sensível do que o teste comercial *MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit* (Lonza).
- As imagens da microscopia eletrônica de varredura deram suporte para os resultados obtidos pela PCR em tempo real *in house*.
- A análise filogenética permitiu identificar as espécies detectadas como *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini* e *Mycoplasma hyorhinis*.
- Foi proposto o algoritmo para aplicação da plataforma molecular na rotina dos laboratórios de cultura celulares.

--- ***Referências Bibliográficas***

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREU, G.; MOREL, P.; FORESTIER, F.; DEBEIR, J.; REBIBO, D.; JANVIER, G.; HERVÉ, P. Hemovigilance network in France: organization and analysis of immediate transfusion incident reports from 1994 to 1998. **Transfusion**, v. 42, p. 1356-1364, Oct. 2002.

ARATHOON, W. R.; BIRCH, J. R. Large-scale cell culture in biotechnology, *Science*. v. 232, p. 1390-1395, 1986.

BACZYNSKA, A.; SVENSTRUP, H. F.; FEDDER, J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. **BMC Microbiol.**, v. 6, p. 4-35, Sep. 2004.

BARILE, M. F.; ROTTEM, S. Mycoplasmas in cell culture. In: KAHANE, I.; ADONI, A. **Rapid diagnosis of mycoplasmas**. New York: Plenum Press, 1993. p. 155-189.

BOLSKE, G. Survey of mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. **Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser.**, v. 269, p. 331-340, Nov. 1988.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 4, p. 568-584, Apr. 2004.

BELL, C. A.; UHL, J. R.; HADFIELD, T. L.; DAVID, J. C.; MEYER, R. F.; SMITH, T. F.; COCKERILL, F. R. Detection of *Bacillus anthracis* DNA by Light Cycler PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2897-2902, 2002.

BURD, E. M. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, p. 550-576, Jul. 2010.

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends Mol. Med.**, v. 7, n. 6, p. 259-264, Jun. 2001.

DABRAZHYNESKAYA, A.; FURTAK, V.; VOLOKHOV, D.; BECK, B.; CHIZHIKOV, V. Preparation of reference stocks suitable for evaluation of alternative NAT-based mycoplasma detection methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 100-108, Sep. 2013.

DEUTSCHMANN, S. M.; KAVERMANN, H.; KNACK, Y. Validation of a NAT-based Mycoplasma assay according European Pharmacopoeia. **Biologicals**, v. 38, p. 238-248, Mar. 2010.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C.; DIRKS, W.G.; MACLEOD, R. A. F. Mix-ups and mycoplasma: The enemies within. **Leukemia Res.**, v. 26, p. 329–333, Apr. 2002.

DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology.**, v. 39, p. 75-90, Aug. 2002.

DUSSURGET, O.; ROULLAND-DUSSOIX, D. Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 953–954, Mar. 1994.

FIORINA, P.; VOLTARELLI, J.; ZAVAZAVA, N. Immunological Applications of Stem Cells in Type 1 Diabetes. **Endocr. Rev.**, v. 32, n. 6, p. 725-754, Dec. 2011.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D. et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, p. 397–403, 1995.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp. Hematol.**, v. 4, n. 5, p. 267-274, Sep. 1976.

GARNER, C. M.; HUBBOLD, L. M.; CHAKRABORTI, P. R. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. **Br J Biomed Sci.** v. 57, p. 295–301, 2000.

GOLDMAN, M.; SHER, G.; BLAJCHMAN, M. Bacterial contamination of cellular blood products: the Canadian perspective. **Transfusion**, v. 23, p. 17-19, 2000.

GOULET, M.; DULAR, R.; TULLY, J. G.; BILLOWES, G.; KASATIYA, S. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2823–2825, Nov. 1995.

GRAU, O.; KOVACIC, R.; GRIFFAIS, R.; MONTAGNIER, L. Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma pirum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 106, p. 327–334, Feb. 1993.

GRAY, M. W.; SANKOFF, D.; CEDERGREN, R. J. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 12, p. 5837-5852, Jul. 1984.

GUO, C. J.; GAO, Y.; HOU, D.; SHI, D. Y.; TONG, X.M.; SHEN, D.; XI, Y. M.; WANG, J. F. Preclinical transplantation and safety of HS/PCs expanded from human umbilical cord blood. **World J Stem Cells**; v. 3, p. 43–52, 2011.

HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H.; NOZAWA, K.; NAKAGAWA T.; ASADA, K.; KATO, I. Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S–23S rRNA intergenic spacer regions. **Res. Microbiol.**, v. 144, p. 489–493, Jul-Aug 1993.

HARDEGGER, D.; NADAL, D.; BOSSART, W.; ALTWEGG, M.; DUTLY, F. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by real-time PCR. **J. Microbiol. Methods**, v. 41, p. 45–51, Jun. 2000.

HAY, R. J.; MACY, M. L.; CHEN, T. R. Mycoplasma infection of cultured cells. **Nature**, v. 339 (6224), p. 487–488, Jun. 1989.

HIMMELREICH, R.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; PIRKL, E.; LI, B. C.; HERRMANN, R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 4420–4449, 1996.

HU, M.; BUCK, C.; JACOBS, D.; PAULINO, G.; KHOURI, H. Application of PCR for detection and identification of mycoplasma contamination in virus stocks. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 31A, p. 710–715, Jan. 1995.

ISHIKAWA, Y.; KOZAKAI, T.; MORITA, H.; SAIDA, K.; OKA, S.; MASUO, Y. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using Sybr Green-based real-time polymerase chain reaction. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 42, p. 63–69, Mar. 2006.

JAUREGUI, L. H.; HIGGINS, J.; ZARLENGA, D.; DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K. Development of real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2065–2071, Jun. 2001.

LE BLANC, K.; PITTENGER, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. **Cytotherapy**, v. 7, n. 1, p. 36–45, Mar. 2005.

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

LO, S. C.; HAYES, M. M.; TULLY, J. G.; WANG, R. Y. H.; KOTANI, H.; PIERCE, P. S.; ROSE, D. L.; SHIH, J. W. K. *Mycoplasma penetrans* sp. Nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. **Int J Sys Bact.**, v. 42, p. 357–364, Jul. 1992.

LO, S. C. Mycoplasmas in AIDS. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 525–545.

MATTOCKS, C. J.; MORRIS, M. A.; MATTHIJS, G.; SWINNEN, E.; CORVELEYN, A.; DEQUEKER, E. et al. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. **Nature**, v. 12, p. 1276-1288, Jul. 2010.

MCGARRITY, G. J.; KOTANI, H.; BUTLER, G. H. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 445–454.

MCGARRITY, G. J.; VANAMAN, V.; SARAMA, J. Cell culture techniques. **Am Soc Microbiol News**, v. 51, p. 170–183, 1985.

MEDVEDEVA, E. S.; BARANOVA, N. B.; MOUZYKANTOV, A. A.; GRIGORIEVA, T. Y.; DAVYDOVA, M. N.; TRUSHIN, M. V. et al. Adaptation of mycoplasmas to antimicrobial agents: *Acholeplasma laidlawii* extracellular vesicles mediate the export of ciprofloxacin and a mutant gene related to the antibiotic target. **Scientific World Journal**, Jan. 2014.

MILLER, G. G.; RAKOVSKAIA, I. V.; POKIDYSHEVA, L. N.; KORABLINA, E. V.; TITOVA, I. V. Mechanism of interaction between HIV and *Mycoplasma arginini* in vitro. **Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.** v. 4, p. 49-53, Jul.-Aug. 2009.

MINGUELL, J. J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Braz J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 8, p. 881-887, Aug. 2000.

MIYAKI, C.; PRAL, M. M.; GALLINA, N. M. F.; RIZZO, E. *Mycoplasma* como contaminante de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. **Rev. Saúde públ.**, v. 23 (1), p. 39-44, 1989.

PEACOCK, S. Health Care: Bring microbial sequencing to hospitals. **Nature**, v. 509, n. 7502, p. 557-559, May 2014.

PEREDELTCOUK, M.; DAVID, S. A. W.; BHATTACHARYA, B.; VOLOKHOV, D. V.; CHIZHIKOV, V. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 54-60, Aug. 2010.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, Apr. 1999.

RAZIN, S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. **Mol. Cell. Probes.**, v. 8, p. 497–511, 1994.

RAZIN, S. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 3–22.

RAZIN, S. The mycoplasmas. **Microbiol. Rev.**, v. 42, p. 414–470, 1978.

RAWADI, G.; DUSSURGET, O. Advances in PCR-based detection of micoplasmas contaminating cell cultures. **PCR Methods Appl.**, v. 4, p. 199–208, Feb. 1995.

Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 9: BRASIL. Resolução nº 9, de 14 de Março de 2011. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Cap. III, Seção XIII, Art. 60.

RIBAUT, S.; FAUCON, A.; GRAVE, L.; NANNINI, P.; FAURE, I. B. Detection of bacteria in red blood cell concentrates by the Scansystem method. **J Clin Microbiol.**, v. 43, p. 2251–2255, May. 2005.

ROBINSON, L. B.; WICHELHAUSEN, R. H.; ROIZMAN, B. Contamination of Human Cell Cultures by Pleuropneumonia-like Organisms. **Science**. v. 124, p. 1147–1148 (1956).

SHCHEBLYAKOV, D. V.; DIU, L.; ZUBKOVA, O. V.; SHMAROV, M. M.; RAKOVSKAIA, I. V.; NARODITSKIĬ, B. S.; GINTSBURG, A. L.; GUDKOV, A. V. Mycoplasma M. arginini infection induces constitutive activation of NF-KappaB and inhibits apoptosis in cells expressing toll-like receptors TLR2/6. **Mol Gen Mikrobiol Virusol**. v. 4, p. 6–10, 2008.

SHIMIZU, T.; ARAI, S.; IMAI, H.; OISHI, T.; HIRAMA, M.; KOITO, A.; KIDA, Y.; KUWANO, K. Glycoglycerolipid from the membranes of *Acholeplasma laidlawii* binds to human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) and accelerates its entry into cells. **Curr Microbiol**. v. 48, p. 182, 2004.

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M. et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Res.**, v. 312, n. 1, p. 31–40, Apr. 2003.

TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 2766–2774, Jun. 2001.

TANG, J.; HU, M.; LEE, S.; ROBLIN, R. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. **J. Microbiol. Methods.**, v. 39, p. 121–126, Jan. 2000.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 38A, p. 79–85, Feb. 2002.

UPHOFF, C. C.; GIGNAC, S. M.; DREXLER, H. G. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. **J Immunol Methods**, v. 149, p. 43-53, Apr. 1992.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; JOHANSSON, K. E.; GALAMA, J. M. D.; KISSING, J.; BÖLSKE, G.; VAN DER LOGT, J. T. M.; MELCHERS, W. J. G. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 149–152, Jan. 1994.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol.**, v. 12, n. 11, p. 502-508, Nov. 2002.

VOLOKHOV, D.V.; GRAHAM, L. J.; BRORSON, K.A.; CHIZHIKOV, V.E. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. **Mol Cell Probes**, v. 25 (2-3), p. 69-77, 2011.

WEISBURG, W. G.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; PETZEL, J. P.; OYAIZU, H.; YANG, D. et al. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **J. Bacteriol.**, v. 171, p. 6455-6467, Dec. 1989.

WIRTH, M.; BERTHOLD, E.; GRASHOFF, M.; PFUTZNER, H.; SCHUBERT, U.; HAUSER, H. Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. **Cytotechnology.**, v. 16, p. 67–77, 1994.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 221–271, 1987.

YOUNG, H. E.; BLACK, A. C., Jr. Adult stem cells. **Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.**, v. 276, n. 1, p. 75-102, Jan. 2004.

YOUNG, L.; SUNG, J.; STACEY, G.; MASTERS, J. R. Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nature Protocols**, v. 5, p. 929-934, May. 2010.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice I – Descrição detalhada dos resultados obtidos para o teste de especificidade analítica realizado com DNA de bactérias de relação filogenética próxima as bactérias alvo. Valores aproximados para o Ct (*cycle threshold*).

RÉPLICAS DOS PONTOS	PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i>								
	<i>Streptococcus uberis</i>			<i>Lactobacillus sakei</i>			<i>Clostridium perfringens</i>		
	ng/μL	Ct	Tm (°C)	ng/μL	Ct	Tm (°C)	ng/μL	Ct	Tm (°C)
1		26	81,96		26	85,46		25	84,43
1		28	82,13		26	85,79		25	84,60
1		24	82,30		25	85,96		25	84,60
1		27	82,30		26	85,96		25	84,60
1	156,36	27	82,30	50,00	25	86,13	213,20	24	84,77
1		26	82,46		25	86,29		24	84,77
1		27	82,46		25	86,29		25	84,77
1		26	82,63		25	86,46		25	84,77
2		28	82,63		31	86,23		28	84,60
2		31	82,63		30	86,41		28	84,60
2		31	82,63		31	86,46		28	84,77
2		30	82,80		31	86,46		28	84,77
2	15,64	30	82,87	5,00	30	86,63	21,32	28	84,94
2		29	82,96		31	86,63		28	84,94
2		29	82,97		31	86,63		28	84,94
2		29	82,97		31	86,63		28	84,94
3		35	82,80		S/A	S/A		33	84,46
3		31	83,14		S/A	S/A		32	84,60
3		32	83,14		S/A	S/A		31	84,77
3		38	83,40		S/A	S/A		31	84,77
3	1,56	S/A*	S/A	0,5	S/A	S/A	2,13	31	84,77
3		S/A	S/A		S/A	S/A		31	84,94
3		S/A	S/A		S/A	S/A		31	84,94
3		S/A	S/A		S/A	S/A		31	84,94
4		S/A	S/A		S/A	S/A		32	84,77
4		S/A	S/A		S/A	S/A		32	84,94
4		S/A	S/A		S/A	S/A		32	84,94
4		S/A	S/A		S/A	S/A		33	84,94
4	0,16	S/A	S/A	0,05	S/A	S/A	0,21	31	85,12
4		S/A	S/A		S/A	S/A		32	85,12
4		S/A	S/A		S/A	S/A		32	85,12
4		S/A	S/A		S/A	S/A		33	85,29
5		S/A	S/A		S/A	S/A		33	84,94
5		S/A	S/A		S/A	S/A		37	85,08
5		S/A	S/A		S/A	S/A		36	85,12
5		S/A	S/A		S/A	S/A		36	85,29
5	0,02	S/A	S/A	0,005	S/A	S/A	0,02	36	85,29
5		S/A	S/A		S/A	S/A		38	85,29
5		S/A	S/A		S/A	S/A		36	85,46
5		S/A	S/A		S/A	S/A		38	85,46

*: Sem Amplificação.

Apêndice II – Descrição detalhada dos resultados obtidos para o teste de especificidade analítica com DNA de célula eucariótica. Valores aproximados para o Ct (*cycle threshold*).

AMOSTRA	PCR EM TEMPO REAL <i>IN HOUSE</i>		SEQUENCIAMENTO
	Ct	Tm (°C)	<i>BLAST</i>
1	33	81,23	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
2	32	81,23	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
3	29	81,23	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
4	34	81,23	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
5	34	81,40	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
6	35	81,40	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
7	34	81,57	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
8	33	81,57	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
9	33	81,40	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
10	32	81,23	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
11	30	81,40	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
12	34	81,57	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
13	34	82,09	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
14	37	81,91	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
15	32	81,74	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
16	30	81,23	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
17	28	81,05	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
18	33	81,05	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
19	29	81,23	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
20	28	80,71	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
21	31	81,4	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
22	31	81,23	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
23	29	80,54	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
24	32	81,01	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
25	30	80,84	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
26	35	81,01	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
27	32	81,52	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
28	33	81,01	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
29	32	81,53	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
30	34	81,18	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
31	32	81,01	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
32	30	80,84	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
33	32	81,36	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
34	32	81,01	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
35	30	81,01	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
36	31	81,01	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
37	32	80,84	<i>Homo sapiens</i> (Cromossomo 15)
38	27	82,26	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
39	28	82,09	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
40	31	82,78	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
41	13	81,91	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
42	11	82,09	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
43	16	82,09	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
44	12	81,74	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
45	11	81,88	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
46	31	82,23	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
47	13	82,58	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
48	13	82,23	<i>Mycoplasma hyorhina</i> (16S rDNA)
49	31	81,61	Similaridade não encontrada
50	34	82,58	Similaridade não encontrada

Apêndice III – Descrição detalhada dos resultados obtidos pelo teste comercial *MycoAlert*® e pela plataforma molecular *in house* a partir de sobrenadante. Análise comparativa dos resultados quanto à positividade. Valores aproximados para o Ct (*cycle threshold*).

AMOSTRA	RESULTADO DOS TESTES					SEQUENCIAMENTO	
	<i>MycoAlert</i> ® (Lonza)		PCR em Tempo Real <i>In House</i>				
	Razão: B/A***	Interpretação	Ct	Tm (°C)	Interpretação		
1	0,47	Negativo	S/A*	S/A	Negativo	N/R**	
2	0,56	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
3	0,45	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
4	0,48	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
5	0,47	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
6	0,42	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
7	0,47	Negativo	30	82,50	Inconclusivo	<i>Uncultured bacterium</i>	
8	0,47	Negativo	S/A	S/A	Negativo		N/R
9	0,52	Negativo	S/A	S/A	Negativo		N/R
10	0,53	Negativo	S/A	S/A	Negativo		N/R
11	0,45	Negativo	S/A	S/A	Negativo		N/R
12	0,46	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
13	0,41	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
14	0,52	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
15	0,32	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
16	0,50	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
17	0,53	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
18	0,46	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
19	0,52	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
20	0,57	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
21	0,52	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
22	0,51	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
23	0,57	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
24	0,43	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
25	0,52	Negativo	31	82,66	Positivo	<i>Mycoplasma arginini</i>	
26	0,52	Negativo	30	83,01	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	
27	0,58	Negativo	30	81,98	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	
28	64,27	Positivo	13	81,81	Positivo	<i>Mycoplasma arginini</i>	
29	0,52	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
30	0,58	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
31	97,32	Positivo	13	81,46	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	
32	0,55	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
33	0,45	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
34	0,54	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
35	0,56	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
36	0,56	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
37	0,51	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
38	0,50	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
39	0,57	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
40	0,55	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
41	0,48	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
42	0,55	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
43	0,51	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
44	0,57	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
45	0,51	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
46	0,55	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	
47	0,56	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R	

AMOSTRA	RESULTADO DOS TESTES					SEQUENCIAMENTO
	<i>MycoAlert®</i> (Lonza)		PCR em Tempo Real <i>In House</i>			
	Razão: B/A***	Interpretação	Ct	Tm (°C)	Interpretação	
48	0,52	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R
49	0,53	Negativo	31	80,90	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
50	0,48	Negativo	28	80,88	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
51	0,60	Negativo	27	80,72	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
52	38,85	Positivo	15	81,93	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
53	0,63	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R
54	116,50	Positivo	13	81,93	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
55	0,53	Negativo	30	82,97	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
56	0,48	Negativo	31	83,59	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
57	0,54	Negativo	32	83,59	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
58	0,55	Negativo	33	83,41	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
59	0,54	Negativo	34	83,24	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
60	0,46	Negativo	33	83,41	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
61	0,50	Negativo	30	83,41	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
62	0,57	Negativo	35	84,81	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
63	0,57	Negativo	32	82,89	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
64	0,41	Negativo	29	83,76	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
65	30,57	Positivo	16	82,37	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
66	0,53	Negativo	32	82,48	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
67	0,55	Negativo	S/A	S/A	Negativo	N/R
68	0,48	Negativo	27	83,24	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
69	0,58	Negativo	31	82,37	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
70	29,30	Positivo	14	82,02	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
71	61,06	Positivo	14	82,02	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
72	24,48	Positivo	11	82,54	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
73	0,56	Negativo	33	82,54	Inconclusivo	<i>Uncultured bacterium</i>
74	37,34	Positivo	17	82,02	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
75	104,28	Positivo	14	81,37	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
76	31,44	Positivo	11	82,54	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
77	79,39	Positivo	15	82,72	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
78	36,78	Positivo	25	83,41	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
79	0,72	Negativo	21	83,59	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
80	0,50	Negativo	24	83,76	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
81	0,46	Negativo	25	83,24	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
82	0,82	Negativo	27	83,24	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
83	35,05	Positivo	17	82,54	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
84	74,98	Positivo	15	82,72	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
85	18,46	Positivo	19	82,37	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
86	0,38	Negativo	24	83,24	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
87	0,69	Negativo	26	83,24	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
88	12,30	Positivo	18	82,02	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
89	0,23	Negativo	23	83,41	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
90	30,24	Positivo	16	82,37	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
91	19,17	Positivo	16	83,41	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
92	30,81	Positivo	17	82,02	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
93	24,40	Positivo	16	82,54	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
94	30,19	Positivo	16	82,02	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
95	0,44	Negativo	30	82,04	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
96	0,52	Negativo	22	83,74	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
97	20,44	Positivo	16	83,4	Positivo	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
98	10,46	Positivo	18	82,04	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
99	0,48	Negativo	20	82,04	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>

AMOSTRA	RESULTADO DOS TESTES					SEQUENCIAMENTO
	MycoAlert® (Lonza)		PCR em Tempo Real <i>In House</i>			
	Razão: B/A***	Interpretação	Ct	Tm (°C)	Interpretação	
100	0,53	Negativo	29	82,89	Positivo	<i>Acholeplasma laidlwaii</i>
101	0,48	Negativo	30	82,55	Positivo	<i>Acholeplasma laidlwaii</i>
102	0,44	Negativo	29	82,55	Positivo	<i>Acholeplasma laidlwaii</i>
103	0,56	Negativo	29	82,72	Positivo	<i>Acholeplasma laidlwaii</i>
104	29,12	Positivo	17	81,87	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
105	42,24	Positivo	15	82,04	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
106	24,65	Positivo	17	81,53	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
107	17,53	Positivo	19	81,87	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
108	37,40	Positivo	14	82,89	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
109	9,80	Positivo	20	82,04	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
110	27,43	Positivo	16	81,87	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
111	86,00	Positivo	14	81,87	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
112	41,63	Positivo	14	81,87	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
113	0,54	Negativo	29	82,55	Positivo	<i>Acholeplasma laidlwaii</i>
114	0,94	Inconclusivo	22	81,87	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
115	31,85	Positivo	15	81,87	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
116	85,75	Positivo	13	81,87	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
117	77,69	Positivo	14	82,04	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
118	1,56	Positivo	4,8	81,7	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
119	0,67	Negativo	30	82,55	Positivo	<i>Acholeplasma laidlwaii</i>
120	0,48	Negativo	29	82,72	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
121	0,29	Negativo	28	82,72	Positivo	<i>Acholeplasma laidlwaii</i>
122	0,62	Negativo	30	82,72	Positivo	<i>Acholeplasma laidlwaii</i>
123	23,97	Positivo	9,1	82,04	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
124	29,82	Positivo	17	82,04	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
125	0,26	Negativo	28	82,06	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
126	7,60	Positivo	15	81,71	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
127	0,21	Negativo	30	80,32	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
128	26,14	Positivo	17	81,71	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
129	67,01	Positivo	13	81,89	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
130	31,81	Positivo	17	81,89	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
131	65,20	Positivo	15	81,71	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
132	20,11	Positivo	14	81,57	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
133	261,64	Positivo	11	81,57	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>
134	120,45	Positivo	12	81,74	Positivo	<i>Mycoplasma hyorhinitis</i>

*: Sem Amplificação.

**: Sequenciamento Não Realizado.

***: A e B = leituras de quimioluminescências.

Valores Referência do teste *MycoAlert®*:

<0,9 – Negativo

0,9 a 1,2 – Inconclusivo (Manter em quarentena e testar novamente em 24h)

>1,2 – Positivo

Interpretação dos Resultados da PCR em Tempo Real *In House*:

Sem amplificação e sequenciamento não realizado – Negativo

Amplificação e sequenciamento “Uncultured bacterium” – Inconclusivo

Amplificação e sequenciamento com espécies relacionadas – Positivo

Números de identificação (*GenBank*) obtidos pelo *BLAST* para as sequências analisadas:

AY920083.1; JQ940979.1: *Uncultured bacterium* (amostra 7 e 73 respectivamente)

AF258794.1: *Mycoplasma hyorhinitis*

JQ903580.1: *Mycoplasma arginini*

NR_074448.1; JN543265.1: *Acholeplasma laidlawii*

Apêndice IV – Número de acesso no *GenBank* das espécies utilizadas na construção da árvore filogenética.

ESPÉCIE	NÚMERO DE ACESSO (<i>GenBank</i>)
<i>Mycoplasma iowae</i>	AM073012.2
<i>Mycoplasma penetrans</i>	JN935872.1
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	AB680686.1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	AB680604.1
<i>Mycoplasma genitalium</i>	X77334.1
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	AB680693.1
<i>Mycoplasma bovis genitalium</i>	AB680692.1
<i>Mycoplasma agalactiae</i>	AJ419903.1
<i>Mycoplasma californicum</i>	AB576869.1
<i>Mycoplasma fermentans</i>	AB680685.1
<i>Mycoplasma bovis</i>	AJ419905.1
<i>Mycoplasma synoviae</i>	AM073015.1
<i>Mycoplasma capricolum</i>	AF170102.1
<i>Mycoplasma crocodyli</i>	U63137.1
<i>Mycoplasma arginini</i>	AF443604.1
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	AB680690.1
<i>Mycoplasma hominis</i>	AB680681.1
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	AB680694.1
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Y00149.1
<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	DQ156347.1
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	AB680688.1
<i>Mycoplasma neurolyticum</i>	AB680668.1
<i>Mycoplasma orale</i>	AB680624.1
<i>Mycoplasma salivarium</i>	AB680625.1
<i>Mycoplasma sualvi</i>	AF412988.1
<i>Mycoplasma mycoides</i>	U26049.1
<i>Mycoplasma putrefaciens</i>	U26055.1
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	AB680603.1
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	L08642.1
<i>Ureaplasma parvum serovar</i>	AF073456.1
<i>Spiroplasma apis</i>	GU993267.1
<i>Spiroplasma citri</i>	AM157769.1
<i>Spiroplasma mirum</i>	JX898939.1

Anexos

ANEXOS

Anexo I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 3.500/2013, referente à utilização do sobrenadante de culturas de células humanas.

USP - RIBEIRÃO assistência - ensino - pesquisa	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -	Plataforma Brasil
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular para Detecção de Mycoplasma spp em Culturas Celulares.		
Pesquisador: Simone Kashima Haddad		
Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.		
Versão: 1		
CAAE: 12703813.9.0000.5440		
Instituição Proponente: Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto		
Patrocinador Principal: Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 234.274		
Data da Relatoria: 07/04/2013		
Apresentação do Projeto:		
<p>A segurança das células cultivadas é uma das principais preocupações em terapia celular. Atualmente, a contaminação por micoplasmas representa o principal problema que pode inviabilizar a infusão de células em pacientes imunossuprimidos. A identificação precoce de culturas contaminadas pode, juntamente com medidas corretivas, evitar a propagação do microorganismo para as demais culturas celulares. Portanto, a adoção de metodologias analíticas que garantam células livres deste e de qualquer outro contaminante é de extrema importância. Dentre os principais limitantes para adoção de metodologias de detecção de micoplasmas destacam-se o alto custo da análise e o tempo necessário para importação dos kits comerciais. Desta forma, a necessidade de garantir a qualidade e a segurança às células cultivadas nos Centros de Tecnologia Celular incita-nos a desenvolver, padronizar e implementar uma plataforma molecular (PCR em tempo real) para detecção de micoplasmas em culturas celulares. Os pesquisadores solicitam dispensa do TCLE, visto que nesse projeto não serão utilizadas amostras humanas, mas apenas o sobrenadante do cultivo destas, que normalmente é desprezado. A rotina dos laboratórios de cultura celular consiste, dentre outras atividades, em manter células em cultivo viáveis para realização de experimentos ou para posterior infusão em pacientes. Estas células são cultivadas em meios específicos que fornecem os nutrientes necessários à sua manutenção. Uma</p>		
Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO		
Bairro: MONTE ALEGRE		
CEP: 14.048-900		
UF: SP		
Município: RIBEIRÃO PRETO		
Telefone: (16)3602-2228		
Fax: (16)3633-1144		
E-mail: cep@hcrp.usp.br		

Anexo I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 3.500/2013, referente à utilização do sobrenadante de culturas de células humanas.

<p>USP - RIBEIRÃO assistência - ensino - pesquisa</p>	<p>HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -</p>
<p>vez esgotado os nutrientes deste meio (sobrenadante), este é substituído por um meio novo e o sobrenadante recolhido é então descartado. Este projeto visa utilizar como amostra este sobrenadante esgotado que seria descartado e pretende desenvolver um produto inovador e com tecnologia nacional, garantindo a produção de células com qualidade, segurança e eficiência. Metodologia: 300 amostras teste obtidas de sobrenadante de culturas de diferentes linhagens celulares que estão sendo cultivadas rotineiramente nos laboratórios de pesquisa do HRP. Como controle positivo será utilizado padrão de DNA de <i>Mycoplasma</i> spp (ATCC). Como controle negativo será utilizado água estéril ou meio de cultura que tenham produzido previamente resultados negativos tanto na PCR convencional quanto no kit comercial. Será extraído DNA bacteriano com uso do kit QIAamp DNA mini (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. Após, serão avaliados o alinhamento múltiplo dos genomas obtidos do GenBank e os primers e a sonda para regiões conservadas dentro do gene 16SrRNA serão desenhados manualmente. Para o alinhamento serão utilizados os genomas das espécies <i>Acholeplasma laidlawii</i>, <i>Mycoplasma arginini</i>, <i>M. fermentans</i>, <i>M. hyorhinis</i>, <i>M. orale</i>, <i>M. pneumoniae</i>, <i>M. gallisepticum</i>, <i>M. synoviae</i> e <i>Spiroplasma citri</i>, <i>M. arthritis</i>, <i>M. genitalium</i>, <i>M. hominis</i>, <i>M. penetrans</i>, <i>M. salivarium</i>, <i>Ureaplasma urealyticum</i>, <i>M. bovis</i>, <i>M. hyopneumoniae</i> e <i>M. pirum</i>. Os parâmetros dos primers e da sonda (temperatura de melting, formação de dímeros, conteúdo de guanina e citosina) serão verificados com o programa Oligo Analyzer (http://www.idtdna.com/analyzer). Será construído um plasmídeo recombinante com o vetor TOPO (Invitrogen) contendo a região gênica escolhida do <i>Mycoplasma</i>. O DNA plasmidial será extraído através do QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN), conforme instruções do fabricante, e sua concentração será avaliada por meio de espectrofotometria (NanoDrop 2000, ThermoScientific). Esse plasmídeo recombinante purificado será sequenciado (ABI Prism 377, Applied Biosystems) e a sequência obtida será avaliada por meio de alinhamento múltiplo dos genomas obtidos do GenBank para região gênica em estudo. A concentração do plasmídeo recombinante será testada em triplicata e paralelo com concentrações de DNA padrão referência. Diluições seriadas com razão 10, variando de 1000000 a 1 cópias/μL do DNA plasmidial serão realizadas. Uma relação linear será obtida entre os valores de Ct (cycle threshold) e as concentrações de log10 de DNA de <i>Mycoplasma</i>. Esta curva padrão será utilizada para a quantificação de DNA viral na amostras teste. A PCR em tempo real será padronizada no equipamento ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Neste sistema, todas as amostras serão testadas em triplicata a fim de evitar resultados falso-positivos ou falsonegativos. Os resultados obtidos aqui serão comparados com os resultados produzidos por kits comerciais. Para validação do método, serão avaliados os parâmetros sensibilidade analítica e diagnóstica, especificidade analítica e diagnóstica, precisão e robustez.</p>														
<table> <tr> <td colspan="2">Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Bairro: MONTE ALEGRE</td> <td></td> <td>CEP: 14.048-900</td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: RIBEIRÃO PRETO</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (16)3602-2228</td> <td>Fax: (16)3633-1144</td> <td>E-mail: cep@hcrp.usp.br</td> </tr> </table>			Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO			Bairro: MONTE ALEGRE		CEP: 14.048-900	UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO		Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br
Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO														
Bairro: MONTE ALEGRE		CEP: 14.048-900												
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO													
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br												

Anexo I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 3.500/2013, referente à utilização do sobrenadante de culturas de células humanas.

<p>HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -</p>
---	---

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: desenvolver uma plataforma molecular para detectar a presença de dezoito (18) espécies de micoplasmas nas culturas celulares destinadas tanto a pesquisa acadêmica quanto à terapia celular e assim garantir segurança e qualidade às mesmas.

Objetivo Secundário: 1. Definir o tipo de amostra e o método de processamento para obtenção do material genético tanto de espécies extracelulares quanto das espécies intracelulares; 2. Estabelecer e padronizar uma plataforma de PCR em tempo real para a detecção das seguintes espécies de micoplasma: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *Spiroplasma citri*, *M. arthritis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. penetrans*, *M. salivarium*, *Ureaplasma urealyticum*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* e *M. pirum*. 3. Determinar especificidade e sensibilidade do método desenvolvido; 4. Validar a metodologia proposta através de comparação dos resultados obtidos com outros kits comerciais para detecção de micoplasma; 5. Analisar a viabilidade econômica da metodologia desenvolvida; 6. Aplicar a metodologia como controle de qualidade na rotina dos laboratórios do Hemocentro de Ribeirão Preto, tanto para cultura de células tronco destinadas à terapia, quanto para cultura de linhagens de células de mamíferos empregadas nas pesquisas científicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este projeto não implica em risco a seres humanos, uma vez que o mesmo consiste em desenvolver um teste que somente utilizará como amostra o sobrenadante de culturas celulares. Os riscos inerentes a este projeto, se é que assim pode ser chamado, são relativos à especificidade e sensibilidade do teste e a sua capacidade em produzir resultados falso-negativos ou falso-positivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em meu entendimento, o projeto não se enquadra nas competências do CONEP por não envolver Pesquisa envolvendo seres humanos (CNS 196/96, II.18). O projeto é cientificamente e socialmente relevante. A metodologia proposta parece ser adequada aos propósitos e não envolve riscos diretos ou indiretos a seres humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: o Projeto de Pesquisa com pedido de dispensa do TCLE bem fundamentado, bibliografia, cronograma e orçamento; o compromisso de respeito à resolução 196/96 do CNS, da instituição proponente e do pesquisador. O Orçamento foi aprovado pela UPC.

Recomendações:

Recomendo que o CEP reconheça que o estudo não se enquadra nas competências do Sistema CEP-CONEP, pois não envolve seres humanos ou parte deles, nem direta ou indiretamente o manejo de seus dados, informações ou material biológico.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO		CEP: 14.048-900
Bairro: MONTE ALEGRE		
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO	
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo I – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 3.500/2013, referente à utilização do sobrenadante de culturas de células humanas.

USP - RIBEIRÃO assistência - ensino - pesquisa	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -	Plataforma Brasil
--	---	---

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Sem pendências

Situação do Parecer:
Retirado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIBEIRÃO PRETO, 02 de Abril de 2013

Assinador por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Anexo II – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 12.602/2013, referente à utilização de células humanas cultivadas.

<p>USP - RIBEIRÃO assistência - ensino - pesquisa</p>	<p>HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -</p>
<p align="center">PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</p>												
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p>												
<p>Título da Pesquisa: Desenvolvimento de uma Plataforma Molecular para Detecção de Mycoplasma em Culturas Celulares.</p>												
<p>Pesquisador: Simone Kashima Haddad</p>												
<p>Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.</p>												
<p>Versão: 1</p>												
<p>CAAE: 21395713.0.0000.5440</p>												
<p>Instituição Proponente: Fundação Hemocentro de Riberão Preto</p>												
<p>Patrocinador Principal: Fundação Hemocentro de Riberão Preto</p>												
<p>DADOS DO PARECER</p>												
<p>Número do Parecer: 477.117</p>												
<p>Data da Relatoria: 09/09/2013</p>												
<p>Apresentação do Projeto:</p>												
<p>Trata-se de projeto de mestrado da aluna Mayra Dorigan de Macedo sob orientação da Profa. Dra. Simone Kashima Haddad. Considera-se que em terapia celular, a segurança das células cultivadas é uma das principais preocupações. A contaminação destas por micoplasmas é, atualmente, o principal problema que pode inviabilizar a infusão de células em pacientes imunossuprimidos. A adoção de metodologias analíticas que garantam células livres deste e de qualquer outro contaminante é de extrema importância. Dentre os principais limitantes para adoção de metodologias de detecção de micoplasmas destacam-se o alto custo da análise e o tempo necessário para importação dos kits comerciais. Desta forma, a necessidade de garantir a qualidade e a segurança às células cultivadas nos Centros de Tecnologia Celular incita-nos a desenvolver, padronizar e implementar uma plataforma molecular (PCR em tempo real) para detecção de micoplasmas em culturas celulares, uma vez que a identificação precoce desta contaminação pode juntamente com as medidas corretivas, evitar a propagação do micoplasma para as demais culturas celulares. Assim, atenderemos a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 9, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 14 de Março de</p>												
<table border="0"> <tr> <td>Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO</td> <td>CEP: 14.048-900</td> </tr> <tr> <td>Bairro: MONTE ALEGRE</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Município: RIBEIRÃO PRETO</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (16)3602-2228</td> <td>Fax: (16)3633-1144</td> </tr> <tr> <td></td> <td>E-mail: cep@hcrp.usp.br</td> </tr> </table>			Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO	CEP: 14.048-900	Bairro: MONTE ALEGRE		UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO	Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144		E-mail: cep@hcrp.usp.br
Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO	CEP: 14.048-900											
Bairro: MONTE ALEGRE												
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO											
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144											
	E-mail: cep@hcrp.usp.br											

Anexo II – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 12.602/2013, referente à utilização de células humanas cultivadas.

Continuação do Parecer: 477.117

2011, a qual exige o cumprimento de normas para garantia da qualidade das células destinadas à terapia celular. Além disso, este trabalho pretende desenvolver um produto inovador e com tecnologia nacional, garantindo a produção de células com qualidade, segurança e eficiência.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal deste projeto é desenvolver uma plataforma molecular para detectar a presença de dezoito (18) espécies de micoplasmas nas culturas celulares destinadas tanto a pesquisa acadêmica quanto à terapia celular e assim garantir segurança e qualidade às mesmas. Abaixo, encontram-se descritas as principais metas a serem alcançadas.

1. Definir o tipo de amostra (sobrenadante ou concentrado celular) e o método de processamento para obtenção do material genético tanto de espécies extracelulares quanto das espécies intracelulares;
2. Estabelecer e padronizar uma plataforma de PCR em tempo real para a detecção das seguintes espécies de micoplasma: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *Spiroplasma citri*, *M. arthritidis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. penetrans*, *M. salivarium*, *Ureaplasma urealyticum*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* e *M. pirum*.
3. Determinar especificidade e sensibilidade do método desenvolvido;
4. Validar a metodologia proposta através de comparação dos resultados obtidos com outros kits comerciais para detecção de micoplasma;
5. Analisar a viabilidade econômica da metodologia desenvolvida;
6. Aplicar a metodologia como rotina nos laboratórios do Hemocentro de Ribeirão Preto, tanto para cultura de células tronco destinadas à terapia, quanto para cultura de linhagens de células de mamíferos empregadas nas pesquisas científicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este projeto não implica em risco a seres humanos e animais, uma vez que o mesmo consiste em desenvolver um teste molecular que utilizará DNA extraído de sobrenadante e células-tronco de pacientes submetidos à terapia celular. Os riscos inerentes a este projeto, se é que assim pode ser chamado, são relativos à especificidade e sensibilidade do teste e a sua capacidade em produzir resultados falso-negativos ou falso-positivos. Contudo, estes parâmetros serão avaliados durante a etapa de validação do teste desenvolvido com intuito de alcançar os padrões exigidos.

Benefícios:

Para infusão de células-tronco expandidas in vitro em pacientes é necessário a realização de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo II – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 12.602/2013, referente à utilização de células humanas cultivadas.

Continuação do Parecer: 477.117

diferentes metodologias analíticas para garantir a segurança, pureza, potência, eficácia e estabilidade das células. Devido ao baixo tempo de prateleira (shelf-life) destas células, as mesmas devem, idealmente, ser infundidas o mais breve possível após o término do processo de expansão. Para tal, as metodologias analíticas para controle de qualidade das células, que inclui a detecção de micoplasmas, devem ser de simples execução, gerar resultados rápidos e possuir custo efetivo. A metodologia para detecção de micoplasmas pode ser considerada um dos pontos críticos do processo de garantia da qualidade das células destinadas à infusão em pacientes, uma vez que estes microrganismos são de difícil identificação por microscopia e na maioria das vezes não há teste rápido e de custo reduzido para sua detecção. O cultivo em ágar é considerado o teste padrão ouro, no entanto, este ensaio pode perder algumas espécies que necessitam de condições de cultura especializadas, além de levar 28 dias e precisar de várias passagens para confirmar a presença do micoplasma. Esta demora pode provocar uma propagação da contaminação para outras culturas. Com isso, experimentos podem ser influenciados negativamente e até mesmo perdidos, arrastando com eles verbas e longos períodos de trabalho. No entanto, o prejuízo maior está nas células destinadas à infusão em pacientes. O preparo do doador e paciente, o procedimento desconfortável de coleta das células e o cultivo das mesmas é o menor dos problemas diante da possibilidade de gerar uma infecção por micoplasma em um paciente debilitado. Recentemente, em 14 de Março de 2011, foi publicado a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 9, a qual dispõe sobre os requisitos mínimos para o funcionamento de Centros de Tecnologia Celular (CTC) de células humanas (células somáticas e germinativas; células-tronco adultas, embrionárias e pluripotentes induzidas) e seus derivados para fins de pesquisa clínica e terapia. Conforme o artigo 60 desta resolução, antes de liberar as células humanas e seus derivados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia, seja para uso autólogo ou alogênico, cultivadas ou não, a fresco ou criopreservadas, com ou sem manipulação extensa, o CTC deve garantir sua segurança e qualidade. Assim o desenvolvimento de um método diagnóstico rápido, sensível, específico, reprodutível, capaz de detectar a maioria das espécies de micoplasma e com custo reduzido é essencial para a atual realidade dos Centros de Tecnologia Celular e para a produção de células com adequada qualidade terapêutica. A padronização de um método de detecção molecular, com menor custo em relação aos métodos comerciais em uso atualmente, trará um importante impacto social e contribuirá para o fortalecimento da capacitação tecnológica no Brasil. O desenvolvimento de uma plataforma por PCR em tempo real para detecção de micoplasma será uma inovação tecnológica brasileira para área da saúde. Esta nova metodologia agregará rapidez em relação ao PCR convencional e menores

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO		CEP: 14.048-900
Bairro: MONTE ALEGRE		
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO	
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo II – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 12.602/2013, referente à utilização de células humanas cultivadas.

Continuação do Parecer: 477.117

custos em relação aos kits comerciais importados. Esta proposta trará como benefícios para a comunidade científica a possibilidade de adoção de normas de qualidade no trabalho rotineiro dos laboratórios de pesquisa e CTCs com baixo custo, além de trazerem para a sociedade brasileira a garantia de infusão de células com adequada segurança e qualidade terapêutica. Além disso, trabalhos neste sentido auxiliam na formação de recursos humanos com características multidisciplinares capazes de lidar com este tipo de tecnologia e com a evolução do mercado de produção de células destinadas à terapia e de cultivo de linhagens para produção de biofármacos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ao longo dos anos, várias técnicas têm sido desenvolvidas a fim de identificar a presença de micoplasmas nas culturas celulares. A maioria dos métodos demanda tempo relativamente longo, envolve avaliações subjetivas e usa medidas complexas. Os métodos de detecção são divididos em direto e indireto. Enquanto o método direto consiste na detecção do microrganismo, a detecção indireta inclui procedimentos que medem um produto de um gene associado ao micoplasma. Um método de detecção ideal deve ser sensível (detecção de verdadeiros positivos), específico (detecção de verdadeiros negativos), preciso, com valor preditivo alto (probabilidade de resultado correto), reprodutível, além de simples, rápido, eficiente e com custo-benefício viável. Há vários métodos de detecção utilizados atualmente, porém os mesmos apresentam baixa sensibilidade, são de difícil interpretação, apresentam técnicas longas além do alto custo. Dentre os métodos indiretos, destaca-se a PCR (polymerase chain reaction) convencional que consiste na detecção de produtos de DNA (amplicons) obtidos após a reação de amplificação; os testes imunológicos (sorológicos) e os testes bioquímicos. Entretanto, os testes imunológicos são destinados ao diagnóstico da infecção em humanos e animais e, portanto, possuem aplicação limitada na detecção em cultura celular devido à falta de anticorpos comerciais capazes de reconhecer diferentes espécies. Já os testes bioquímicos, que avaliam a atividade de enzimas específicas de micoplasmas, não identificam a espécie do agente contaminante. Além disso, a enzima-alvo deve estar presente em quantidades significativas e ter meia-vida longa para uma sensibilidade adequada. Assim, este projeto propõe o desenvolvimento e padronização de uma plataforma molecular in house para a detecção de micoplasma em culturas celulares utilizando a PCR em tempo real, uma metodologia simples, de baixo custo, sensível, e altamente específica. A PCR em tempo real agrega algumas vantagens sobre a PCR convencional, pois utiliza sondas específicas que atuam como sinalizadores moleculares tornando o ensaio altamente específico. As reações de PCR em tempo real são mais sensíveis que as reações de end-point porque os dados são obtidos

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

Anexo II – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 12.602/2013, referente à utilização de células humanas cultivadas.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -
Continuação do Parecer: 477.117														
<p>na fase exponencial (os componentes da reação não estão limitados). A reação ocorre em um só passo, o que evita processos pós-PCR, reduzindo a possibilidade de contaminação.</p>														
<p>- Amostras controle: Como controle positivo será utilizado padrão de DNA de Mycoplasma sp (ATCC), para evitar o manuseio do microrganismo e sua eventual propagação. Como controle negativo será utilizado água estéril ou meio de cultura que tenham produzido previamente resultados negativos tanto na PCR convencional quanto no kit comercial.</p>														
<p>- Amostras a serem testadas: Serão analisados concentrados celulares e seus sobrenadantes provenientes de culturas de células tronco de pacientes submetidos à terapia celular e de diferentes linhagens celulares que estão sendo cultivadas rotineiramente nos laboratórios de pesquisa do Hemocentro de Ribeirão Preto.</p>														
<p>As células e sobrenadantes utilizados para obtenção do DNA são derivados de pacientes que estão sob uso clínico de terapia celular, além das linhagens utilizadas em pesquisa. Contudo, os primers e sondas são desenhados para regiões específicas do genoma bacteriano. Assim, o material genético alvo não é o do paciente, mas sim do microrganismo em questão. O teste realizado não irá gerar dados relacionados aos pacientes e permitirá avaliar a qualidade e segurança das amostras a serem utilizadas na terapia, isto é, se estão ou não contaminadas por Mycoplasma.</p>														
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:														
Foi apresentado os seguintes documentos: Projeto de pesquisa, Dispensa do TCLE, Folha de Rosto, Orçamento financeiro, Aprovação da UPC com o de acordo dos responsáveis.														
Recomendações:														
Não há.														
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:														
O CEP aprovou o projeto de pesquisa.														
Situação do Parecer:														
Aprovado														
Necessita apreciação da CONEP:														
Não														
Considerações Finais a critério do CEP:														
Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho.														
<table border="0"><tr><td colspan="2">Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO</td><td></td></tr><tr><td>Bairro: MONTE ALEGRE</td><td></td><td>CEP: 14.048-900</td></tr><tr><td>UF: SP</td><td>Município: RIBEIRÃO PRETO</td><td></td></tr><tr><td>Telefone: (16)3602-2228</td><td>Fax: (16)3633-1144</td><td>E-mail: cep@hcrp.usp.br</td></tr></table>			Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO			Bairro: MONTE ALEGRE		CEP: 14.048-900	UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO		Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br
Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO														
Bairro: MONTE ALEGRE		CEP: 14.048-900												
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO													
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br												

Anexo II – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa. Processo nº 12.602/2013, referente à utilização de células humanas cultivadas.

Continuação do Parecer: 477.117

Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRÃO PRETO, 03 de Dezembro de 2013

Assinador por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Anexo III – Aprovação da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto. Processo nº 297/2012.008-01.

Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 01 de novembro de 2012.

O projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção de Mycoplasma spp em culturas celulares”, foi avaliado por esta Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2012.008-01**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.

Comissão Interna de Biossegurança da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, um de novembro de 2012.

Tathiane Maistro Malta
Membro da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Ilustríssimo Senhores
Mayra Dorigan
Simone Kashima Haddad