

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Rafael Lawson Ferreira

**AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS CLÁSSICAS E ALTERNATIVAS PARA  
DETECÇÃO DE MICOPLASMAS EM CULTURAS CELULARES UTILIZADAS EM  
ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS.**

Rio de Janeiro

2019

Rafael Lawson Ferreira

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS CLÁSSICAS E ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMAS EM CULTURAS CELULARES UTILIZADAS EM ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS.

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientação: Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso.

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na Fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Lawson-Ferreira, Rafael

Avaliação de metodologias clássicas e alternativas para detecção de micoplasmas em culturas celulares utilizadas em ensaios de controle de qualidade de produtos biológicos. / Rafael Lawson-Ferreira. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2019.

90 f. : fig. ; tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

Orientador: Ivano de Filippis.

1. Micoplasma. 2. Determinação. 3. Cultura de Células. 4. Produtos Biológicos. I. Título.

EVALUATION OF CLASSICAL AND ALTERNATIVE DETECTION  
METHODOLOGIES FOR MYCOPLASMA IN CELL CULTURES USED AT  
BIOLOGICAL PRODUCTS QUALITY CONTROL TESTS.

Rafael Lawson Ferreira

AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS CLÁSSICAS E ALTERNATIVAS PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMAS EM CULTURAS CELULARES UTILIZADAS EM ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS BIOLÓGICOS.

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

#### BANCA EXAMINADORA

---

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz.

---

Hélio dos Santos Dutra (Doutor)

Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Rio de Janeiro.

---

Jorge Timenetsky (Doutor)

Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade de São Paulo.

#### ORIENTADOR

---

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz.

À minha família Carolina e Hugo (*in graviditate*).

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Artur e Solange, minha irmã Daniela e minha esposa Carolina por sempre terem acreditado em mim, pela paciência e carinho em todos os momentos;

Aos meus amigos e colegas do INCQS nos diversos setores, escritórios e laboratórios pelo companheirismo e constante incentivo com destaque para Regina Branquinho e Talita Coelho – sempre próximas e solícitas;

Aos amigos de Bio-Manguinhos pela grande ajuda pessoal e material sem as quais este trabalho jamais estaria concluído, notadamente o Laboratório de Tecnologia Recombinante/ Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico e o Setor de Meios de Cultura/ Departamento de Controle da Qualidade;

Aos amigos do Instituto Oswaldo Cruz, pelos preciosos ensinamentos nos diferentes temas deste trabalho;

Aos amigos e sempre colaboradores da Universidade Federal Fluminense, principalmente o Dr. Elimiro Rosendo – grande camarada;

Ao meu orientador, Ivano, pelos conhecimentos trocados e pelo constante incentivo;

À Maysa Clementino, pelas boas conversas e revisão do trabalho;

A todos os meus amigos, dentro e fora da Fundação Oswaldo Cruz, que sempre me deram muito apoio para que eu realizasse este trabalho.

Ao INCQS, na pessoa do diretor Dr. Antônio Eugênio de Almeida, pelo suporte durante o período de realização deste trabalho.

"Um pensamento equivocado pode dar origem a frutíferas investigações e estabelecer verdades de grande valor."

"O maior bem de um homem é uma mente inquieta."

"Um círculo não tem fim".

(Isaac Asimov).

## RESUMO

Micoplasma é o nome comumente empregado para descrever os microrganismos da Classe Mollicutes. O uso extensivo de culturas celulares nos últimos anos e sua frequente contaminação por micoplasmas, juntamente com a elucidação de possuírem os menores genomas dentre os organismos de vida livre, tem despertado interesse para essas bactérias e contribuído para revelar um pouco mais sobre sua biologia. Atualmente, dois métodos são recomendados pelas farmacopéias internacionais para a detecção de micoplasmas em produtos biológicos: o cultivo e a cultura de células indicadora. A partir de 2008, métodos alternativos baseados na amplificação de ácidos nucleicos foram incluídos na Farmacopeia Europeia, podendo ser empregados desde que sejam validados. Materiais de referência internacionais estão disponíveis para a avaliação da comparabilidade de métodos para a detecção de micoplasmas, porém seus custos são bastante elevados. O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde é o Laboratório Nacional de Controle para a análise de produtos biológicos. No entanto, o controle de micoplasmas em produtos biológicos ainda não é preconizado na Farmacopeia Brasileira. Neste estudo foram incorporadas dezoito diferentes cepas de micoplasmas de referência na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária, dentre as recomendadas para o controle de produtos biológicos e utilizadas em painéis internacionais para avaliação de métodos alternativos. Todas essas cepas se mostraram aptas em crescer num único meio de cultura alternativo. Ensaios moleculares de detecção e identidade, baseados em PCR e sequenciamento foram empregados em 55 diferentes amostras de linhagens celulares cedidas por instituições de pesquisa e ensino da cidade do Rio de Janeiro, demonstrando a contaminação de 76,3% das células analisadas e a prevalência de *M. arginini*, *M. hyorhinae* e *M. orale*. A citometria de fluxo utilizando dois marcadores fluorescentes, CFDA e TOPRO, foi padronizada para aferir a viabilidade de *M. gallisepticum* e depois avaliada em diferentes espécies de micoplasmas, tendo sido praticada com sucesso em *M. hyorhinae*, *S. citri* e parcialmente em *A. laidlawii* (apenas um marcador). As metodologias de detecção e identificação de micoplasmas utilizadas neste estudo podem ser empregadas diretamente no controle de qualidade de culturas celulares e avaliação da viabilidade de

microrganismos por citometria de fluxo, nas áreas de produção de material de referência microbiológico e controle de qualidade de produtos.

Palavras chave: Micoplasma. Detecção. Cultura de Células. Citometria de Fluxo.

## ABSTRACT

Mycoplasma is the term usually applied to describe microorganisms of the Mollicutes Class. Recently, mycoplasmas have aroused researchers' interest not only because they have the smallest genomes of all living organisms, but also due to the extensive use of cell cultures, of which they are frequent contaminants. Nowadays, international pharmacopeias recommend two methods for mycoplasma detection in biological products, which are based on culture and indicator cell culture. Since 2008, the European Pharmacopeia has included alternative methods based on nucleic acid amplification as long as they are validated. International mycoplasma reference materials for methods comparison evaluation are available, but their costs are very expensive. The National Institute for Quality Control in Health is the Brazilian National Control Laboratory for biological product analyses. Mycoplasma control, however, is not yet preconized by the Brazilian Pharmacopeia. In the present study, 18 different mycoplasma reference strains, which are used on international panels for the establishment of alternative methods and recommended for biological products quality control, were added in Sanitary Surveillance Reference Bacteria Collection and all these strains were able to grow in a single alternative culture medium. Molecular assays for mycoplasma detection and identification by PCR and nucleotide sequencing were applied to 55 different cell culture samples kindly given by research institutions in the city of Rio de Janeiro and demonstrated a 76.3% rate of mycoplasma contamination, being *M. arginini*, *M. hyorhinitis* and *M. orale* the prevalent species. A viability flow cytometry assay with two fluorescent dyes, CFDA and TOPRO, was standardized for *M. gallisepticum* and then applied to other mycoplasma species, with a better result for *M. hyorhinitis*, *S. citri* and *A. laidlawii* (one of the dyes). The detection and identification methodologies presented here could be directly used in the quality control of cell cultures and mycoplasma viability by flow cytometry would be applied for the production of microbiological reference materials as well as for product quality control.

Keywords: Mycoplasma. Detection. Cell Culture. Flow Cytometry.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
Figura 1	Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do fragmento do <i>rrs</i> de microrganismos da Classe Mollicutes ....	39
Figura 2	Representação esquemática da estratégia para construção da curva de crescimento de <i>M. gallisepticum</i> CBRVS 00734 .....	47
Figura 3	Protocolo citofluorimétrico representativo das beads de tamanho definido Megamix-Plus SSC e Megamix-Plus FSC .....	50
Figura 4	Protocolo representativo da aquisição de micoplasmas vivos e mortos .....	52
Figura 5	Fotografias representativas dos diferentes microrganismos da Classe Mollicutes incorporados na CBRVS, cultivados em meio de Frey modificado sólido com aumento de 100X .....	56
Figura 6	Gel de agarose dos produtos de PCR amplificados pelo ensaio de detecção de micoplasmas a partir dos DNA das cepas da Classe Mollicutes incorporadas na CBRVS .....	58
Figura 7	Ilustração esquemática dos géis de agarose contendo os produtos de PCR amplificados a partir das cepas de bactérias não pertencentes à Classe Mollicutes .....	59
Figura 8	Ilustração esquemática dos géis de agarose contendo os produtos de PCR amplificados a partir das células eucarióticas.	61
Figura 9	Árvore filogenética mostrando a história evolutiva de 39 sequências incompletas do <i>rrs</i> inferida pelo método Neighbor-Joining .....	65
Figura 10	Curva de crescimento experimental de <i>M. gallisepticum</i> CBRVS 00734 .....	67
Figura 11	Imagem esquemática de sobreposição da titulação dos marcadores de viabilidade em células de <i>M. gallisepticum</i> .....	68
Figura 12	Imagem esquemática do <i>overlay</i> da incorporação de fluorescência de CTC .....	69
Figura 13	Imagem esquemática do <i>overlay</i> dos diferentes tratamentos de morte celular avaliados para células de <i>M. gallisepticum</i> .....	71

Figura 14 Histogramas mostrando as médias das porcentagens de células positivamente marcadas nas diferentes espécies..... 74

## LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Microrganismos de referência da Classe Mollicutes, meios de cultura e condições cultivo .....	35
Tabela 2	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento parcial do <i>rrs</i> dos microrganismos da Classe Mollicutes .....	38
Tabela 3	Bactérias não pertencentes à Classe Mollicutes, meios de cultura e condições cultivo .....	41
Tabela 4	Células eucarióticas avaliadas quanto à presença/ ausência de micoplasmas, número de identificação da amostra, tipo de linhagem, fonte biológica e Instituição provedora .....	42
Tabela 5	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o ensaio de detecção de micoplasmas por PCR .....	44
Tabela 6	Oligonucleotídeos iniciadores universais utilizados para confirmar a amplificabilidade do DNA de bactérias não pertencentes à Classe Mollicutes e linhagens celulares eucarióticas .....	46
Tabela 7	Identificação e quantidade dos lotes produzidos para as cepas da Classe Mollicutes incorporadas na CBRVS .....	57
Tabela 8	Células eucarióticas avaliadas quanto a presença/ ausência de micoplasmas, número de identificação, tipo de linhagem, fonte da biológica, Instituição provedora, status da contaminação, espécie identificada por sequenciamento e número de acesso da sequência depositada no GenBank .....	62
Tabela 9	Valores do Log10 das contagens de UFC/ mL nos diferentes pontos de monitoramento das duas culturas-teste .....	66
Tabela 10	Resultados da contagem absoluta de células realizada pelo Cytoflex nas diferentes condições de morte celular avaliadas para estabelecimento do controle de morte .....	72
Tabela 11	Valores de P obtidos na comparação da redução das médias percentuais de viabilidade entre a condição tratado e não-tratado com etanol para os marcadores TOPRO e CFDA .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
µmHg	Micrometro de mercúrio
A	Adenina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Citosina
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CFDA	Diacetato de 5-carboxifluoresceína
CG	Cópias de genoma
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CTC	5-cyano-2,3-di-(p-toluil) cloreto de tetrazólio
CN	Controle negativo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico, do inglês desoxyribonucleic acid
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática, do inglês <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ETOH	Etanol
EXP	Experimental
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Guanina
FSC	Dispersão frontal, do inglês <i>Forward Scatter</i>
FSC–A	Dispersão frontal medida em área, do inglês <i>Forward Scatter–Area</i>
FSC–H	Dispersão frontal medida em altura, do inglês <i>Forward Scatter–Height</i>
h	Hora
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ISO	Organização Internacional para Padronização, do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
mL	Mililitros

min	Minuto
MR	Material de referência
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada fosfatada, do inglês <i>phosphate saline buffer</i>
PCR	<i>Reação em cadeia da polimerase</i> , do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PDA	<i>Parenteral Drug Association</i>
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
Ph Eur	Farmacopeia Europeia do latim <i>Pharmacopoeia Europaea</i>
PPLO	Organismos relacionados à pleuro-pneumonia, do inglês pleuro-pneumonia-like organisms
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para, do Latim Quantum Satis para.
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
<i>rrs</i>	Genes que codificam para o rRNA 16S
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SSC	Disperção lateral, do inglês <i>Side Scatter</i>
SSC–A	Disperção lateral medida em área, do inglês <i>Side Scatter–Area</i>
SSC–H	Disperção lateral medida em altura, do inglês <i>Side Scatter–Height</i>
T	Timina
TBE	Tampão Tris-borato EDTA
TOPRO	TO-PRO <sup>®</sup> 3 Iodide
UFC	Unidades formadoras de colônia
USP	Farmacopeia Americana, do inglês United States Pharmacopoeia
UV	Ultravioleta
VERO	Células de rim de macaco verde africano
VISA	Vigilância Sanitária
xg	Número de vezes a aceleração da gravidade

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1 Micoplasmas</b> .....	19
<b>1.2 Produtos biológicos</b> .....	22
<b>1.3 Micoplasmas e culturas celulares</b> .....	25
<b>1.4 Controle de qualidade de produtos</b> .....	26
<b>1.5 Material de referência</b> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	32
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	32
2.2.1 Estabelecimento de uma micoplasmatoteca na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS) .....	32
2.2.2 Aplicação de PCR de detecção em linhagens celulares .....	32
2.2.3 Desenvolvimento de ensaio de citometria de viabilidade .....	32
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	34
<b>3.1 Estabelecimento da micoplasmatoteca de referência do INCQS</b> .....	34
3.1.1 Aquisição dos microrganismos da Classe Mollicutes .....	34
3.1.2 Cultivo dos microrganismos da classe Classe Mollicutes em meio alternativo.....	35
3.1.3 Liofilização para conservação dos microrganismos .....	36
3.1.4 Controle de qualidade dos lotes de microrganismos da Classe Mollicutes incorporados na CBRVS .....	36
3.1.4.1 <i>Viabilidade e pureza dos lotes de microrganismos da Classe Mollicutes produzidos</i> .....	37
3.1.4.2 <i>Observação morfológica das culturas de microrganismos da Classe Mollicutes</i> .....	37
3.1.4.3 <i>Identidade dos lotes de microrganismos da Classe Mollicutes produzidos</i> .....	37
<b>3.2 Aplicação do PCR para detecção de micoplasmas em linhagens celulares</b> .....	39
3.2.1 Microrganismos pertencentes à Classe Mollicutes .....	39

3.2.2	Microrganismos não pertencentes à Classe Mollicutes .....	40
3.2.3	Culturas celulares eucarióticas .....	41
3.2.4	PCR para detecção de micoplasmas .....	44
3.2.5	Identificação da espécie contaminante por sequenciamento nucleotídico .....	45
3.2.6	Testes de amplificabilidade .....	45
<b>3.3</b>	<b>Citometria de fluxo de viabilidade</b> .....	<b>46</b>
3.3.1	Determinação da curva de crescimento de <i>M. gallisepticum</i> CBRVS 00734 .....	46
3.3.1.1	<i>Preparo das culturas-teste, diluição e plaqueamento</i> .....	47
3.3.1.2	<i>Leitura e cálculo dos resultados</i> .....	48
3.3.2	Padronização da citometria de fluxo de viabilidade para a cepa de <i>M. gallisepticum</i> CBRVS 00734 .....	48
3.3.2.1	<i>Preparo das amostras</i> .....	49
3.3.2.2	<i>Separação celular por tamanho e morfologia</i> .....	49
3.3.2.3	<i>Marcação fluorescente</i> .....	51
3.3.2.4	<i>Aquisição e análise</i> .....	51
3.3.2.5	<i>Estabelecimento do controle de morte</i> .....	52
3.3.3	<i>Aplicação do método padronizado para <i>M. gallisepticum</i> a diferentes espécies da Classe Mollicutes</i> .....	53
3.3.4	Análise estatística dos resultados .....	54
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
4.1	<b>Estabelecimento da micoplasmoteca de referência do INCQS</b> .....	<b>55</b>
4.2	<b>Aplicação do PCR para detecção de micoplasmas em linhagens celulares</b> .....	<b>58</b>
4.3	<b>Citometria de fluxo de viabilidade</b> .....	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>87</b>
	<b>ANEXO 1 – FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA RECOMENDADOS PELO ATCC PARA CADA UMA DAS CEPAS DE MICRORGANISMOS DA CLASSE MOLLICUTES E MEIOS RECOMENDADOS PELAS FARMACOPEIAS AMERICANA E</b>	

**EUROPEIA PARA CONTROLE DE MICOPLASMAS EM PRODUTOS  
BIOLÓGICOS.....**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Micoplasmas

Micoplasma é o nome comumente empregado para descrever os microrganismos da Classe Mollicutes, do latim: “pele suave”, é uma alusão à ausência de parede celular bacteriana rígida. Esses microrganismos são conhecidos como as menores bactérias (300–800 nm) e durante muitos anos foram confundidos com vírus, uma vez que são capazes de transpor os filtros bacterianos usuais. Estão largamente distribuídos na natureza, sendo muitos deles patógenos animais, vegetais e humanos. O uso extensivo de culturas celulares nos últimos anos e sua frequente contaminação por micoplasmas, juntamente com a elucidação dos menores genomas dentre os organismos de vida livre, tem despertado interesse para essas bactérias e contribuído, dessa forma, para revelar um pouco mais sobre sua biologia (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

Esses microrganismos costumam apresentar alta especificidade pelos hospedeiros e tecidos, reflexo de sua limitada capacidade biossintética. Dentre as micoplasmoses humanas, destaca-se o *M. pneumoniae* que é causador de traqueobronquite e pneumonia em pessoas de todas as idades. As espécies *M. hominis* e *Ureaplasma* spp. são responsáveis por uma variedade de complicações urogenitais em adultos, podendo ser patógenos sistêmicos em lactentes e pessoas imunodeprimidas. *Mycoplasma genitalium* é também um importante patógeno urogenital com prevalência cada vez maior - podendo causar uretrite, cervicite e doença inflamatória pélvica. Antibióticos pertencentes aos grupos das tetraciclina, fluoroquinolonas, macrólídeos, aminoglicosídeos e o cloranfenicol são geralmente eficazes no tratamento de micoplasmoses humanas. Casos de resistência à tetraciclina e às quinolonas têm sido relatados em *M. hominis* e em *Ureaplasma* spp. com cada vez mais frequência e a resistência aos macrólídeos é prevalente em isolados clínicos de *M. pneumoniae* na China e no Japão e vem sendo documentada também na Europa e na América do Norte (XUE *et al.*, 2018).

*Mycoplasma gallisepticum* é causador da doença respiratória crônica em galinhas e da sinusite infecciosa. Já *M. synoviae* causa a sinovite infecciosa, uma doença que acomete membranas sinoviais das articulações e bainhas dos tendões dessas aves. Esses dois patógenos aviários acarretam enormes perdas econômicas,

resultado da redução nas taxas de crescimento e ganho de peso dos animais, diminuição da postura e taxa de eclosão dos ovos, assim como aumento dos custos dos procedimentos para sua erradicação, que envolve limpeza e assepsia, medicação e vacinação (KHALDA *et al.*, 2013). Doenças causadas por micoplasmas são contínuas e desafiadoras ameaças também na criação de pequenos ruminantes, dentre elas podemos destacar a pleuropneumonia contagiosa caprina (principalmente em caprinos), agalaxia contagiosa (ovinos e caprinos), pneumonia atípica (geralmente ovinos), além de artrite, mastite, vesiculite seminal, ampulite, epididimite, orquite, uretrite, conjuntivite e meningite, isoladamente ou como síndromes clássicas. Os agentes infecciosos comumente incluem *M. mycoides*, *M. capricolum*, *M. agalactiae*, *M. bovis*, dentre outros (YATOO *et al.*, 2018).

Os micoplasmas podem ser observados nos mais distintos ambientes e hospedeiros. A doença das folhas pequenas em plantas cítricas está diretamente relacionada à sua contaminação por *Spiroplasma citri*, seus sintomas incluem folhas mosqueadas e pequenas, frutos com formatos anormais, baixa estatura das árvores e produção reduzida de frutos (NEJAT; VADAMALAI; DICKINSON, 2011). Lehata, Valenzuela e Riquelme descreveram em 2015 que o gênero *Mycoplasma* é predominante no trato digestivo de polvos e diferentes autores descreveram sequências de micoplasmas em corais de água fria, inclusive com a sugestão de uma nova espécie – "*Candidatus Mycoplasma corallicola*" (NEULINGER *et al.*, 2009).

No ambiente laboratorial, a contaminação por bactérias da classe Mollicutes, majoritariamente dos gêneros *Mycoplasma* e *Acholeplasma*, está entre os problemas mais frequentes associados às culturas de células eucarióticas. Dados da literatura relatam taxas de 15 e 80% de contaminação (LANGDON, 2004). A infecção por micoplasmas causa problemas severos também em colônias de roedores utilizados em laboratório, sendo *M. pulmonis* e *M. arthritidis* as espécies mais prevalentes (GOTO *et al.*, 2012).

É bastante factível argumentar que os micoplasmas estejam bem próximos do conceito de "parasitas-ideais", geralmente vivendo em harmonia com o hospedeiro. As infecções causadas costumam ser leves e crônicas e sua baixa taxa de replicação não deve ser considerada uma deficiência, levando em conta que o parasita só teria a perder ao matar seu hospedeiro (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

A Classe dos Mollicutes pode ser dividida em quatro ordens: (i) Mycoplasmatales, composta pelas espécies dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, (ii) Entomoplasmatales, que abrange as espécies pertencentes aos gêneros *Entomoplasma*, *Mesoplasma* e *Spiroplasma*, (iii) Acholeplasmatales, que inclui o gênero *Acholeplasma* e (iv) Anaeroplasmatales, que compreende os gêneros *Anaeroplasma* e *Asteroleplasma* (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Atualmente apresentam-se como gêneros candidatos: *Bacilloplasma*, *Hepatoplasma*, *Lumbricincola* e *Phytoplasma* (LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE, 2019).

O genoma dos microrganismos da Classe Mollicutes é bem pequeno, varia de 580 a 2.220 mil pares de bases (pb), essa redução do genoma está associada diretamente à sua limitada capacidade metabólica. Não possuem genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos e apenas alguns genes envolvidos na biossíntese de cofatores (vitaminas). A maioria dos micoplasmas não consegue nem mesmo sintetizar ácidos graxos e alguns incorporam fosfolipídios junto com o colesterol para formação de suas membranas. Genes envolvidos na biossíntese de nucleotídeos também são limitados. Seu estilo de vida parasítico coincide com o significativo número de genes associados a proteases e o pequeno número que codifica sistemas de transporte (STAKENBORG, 2005). Devido à sua "simplicidade genética" (~470 genes em *M. genitalium*), os micoplasmas constituíram alvo do debate sobre o conceito do genoma mínimo, ou seja, o menor conjunto de genes necessários e suficientes para o funcionamento celular (KOONIN, 2000; FOOKES *et al.*, 2017). Provavelmente, por essa mesma razão, esses microrganismos tenham sido escolhidos para provar os conceitos do transplante de genomas (LARTIGUE *et al.*, 2007) e da criação de vida a partir de um genoma sintético (GIBSON *et al.*, 2010).

Estão disponíveis atualmente na plataforma Nucleotide do National Center for Biotechnology Information (NCBI) cerca de 80.000 sequências de mollicutes e mais de 240 genomas completos na plataforma Genome, também do NCBI (NUCLEOTIDE, 2019; GENOME, 2019).

Apesar da grande variedade de sequências depositadas em bancos de dados, as sequências dos genes codificadores do RNA ribossomal (rRNA), particularmente o 16S (*rrs*), continuam sendo uma importante ferramenta para filogenia e taxonomia desses microrganismos (SUAREZ-PEREZ *et al.*, 2011 e SCHWARZ *et al.*, 2018). A base da classificação dos mollicutes se deu com os

trabalhos clássicos de William Weisburg, Jack Maniloff e Joseph Tully (WEISBURG *et al.*, 1989; MANILOFF *et al.*, 1992; TULLY *et al.*, 1993).

## 1.2 Produtos biológicos

O termo biofármacos foi criado na década de 1980 e se refere a produtos biológicos produzidos em processos biotecnológicos utilizando tecnologia recombinante. Esses produtos são produzidos em células vivas, enquanto as drogas sintéticas, através de processos químicos. A maioria das drogas sintéticas são pequenas moléculas. Por exemplo, uma molécula de ácido acetilsalicílico é composta por apenas 21 átomos, enquanto os biofármacos são tipicamente 100 a 1000 vezes maiores. São cada vez mais empregados em praticamente todos os ramos da medicina e se tornaram uma das modalidades de tratamento clínico mais eficaz para ampla gama de doenças, incluindo cânceres e distúrbios metabólicos (KESIK-BRODACKA *et al.*, 2017). De janeiro de 2014 a junho de 2018, foram aprovados, nos Estados Unidos e na Europa, 155 biofármacos, sendo 129 distintos ingredientes ativos. Desses produtos, 79% foram produzidos em células de mamíferos e 66,3% especificamente em células de ovário de hamster chinês (CHO). Durante esse período foi caracterizado um aumento contínuo no valor de mercado dos biofármacos, os relatórios financeiros indicam que as vendas acumuladas ultrapassaram 651 bilhões de dólares. Com essas novas aprovações, o número de produtos biofarmacêuticos individuais que obtiveram licença nos Estados Unidos e Europa totaliza 374, sendo 285 ingredientes ativos distintos entre si. Grande destaque deve ser atribuído aos anticorpos monoclonais, essa categoria de biomedicamentos compreendeu 27% e 53% de todas as aprovações comerciais de biofármacos nos Estados Unidos e Europa nos períodos de 2010 a 2014 e 2014 a 2018, respectivamente (WALSH, 2018).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada/ ANVISA nº 55, de 16 de dezembro de 2010, define produto biológico como "medicamento biológico não novo ou conhecido, que contém molécula com atividade biológica conhecida, já registrado no Brasil e que tenha passado por todas as etapas de fabricação (formulação, envase, liofilização, rotulagem, embalagem, armazenamento, controle de qualidade e liberação do lote de produto biológico para uso)." Essa Resolução trata do registro de produtos biológicos e estabelece suas categorias: i) vacinas, ii) soros

hiperimunes, iii) hemoderivados, iv) biomedicamentos, sejam eles obtidos a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal ou por procedimentos biotecnológicos, v) anticorpos monoclonais e vi) medicamentos contendo microorganismos vivos, atenuados ou mortos.

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é o Laboratório Nacional de Controle para a análise de produtos biológicos, tendo como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária (VISA). De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada/ ANVISA nº 73, de 21 de outubro de 2008, a liberação de vacinas e soros hiperimunes heterólogos para consumo no Brasil e também para exportação é responsabilidade do instituto. Todas as vacinas disponibilizadas pelo Programa Nacional de Imunização (PNI) – a saber: vacina contra tuberculose, hepatites A e B, poliomielite, pneumonia, rotavírus, meningite, sarampo, caxumba, rubéola, catapora, HPV, difteria, tétano, coqueluche e gripe –, passam pelo INCQS para serem submetidas a análises específicas de controle de qualidade.

Vacinas são consideradas as mais promissoras ferramentas na prevenção de doenças. São produtos biológicos geralmente administrados a indivíduos saudáveis; muitas das vezes a crianças no início de suas vidas. Nesse sentido, grande ênfase deve ser dada à sua qualidade com vistas a assegurar que sejam eficazes na prevenção ou tratamento de doenças, sem causar danos à saúde. Portanto, o controle da qualidade desses produtos requer procedimentos especiais para evitar a contaminação por agentes adventícios provenientes de matérias-primas ou ambientes, assim como testes para avaliar a potência e imunogenicidade. Dellepiane, Griffiths e Milstien destacaram em 2000 que o controle de qualidade de vacinas sempre se baseou em três componentes básicos: i) controle das matérias-primas, ii) controle do processo produtivo e iii) controle do produto final. Os contínuos avanços técnicos no campo da vacinologia trazem a promessa de desenvolvimento de novas e potentes armas contra ameaças à saúde pública, novas e antigas: malária, deficiências genéticas, gripe pandêmica, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), etc e pressiona os fabricantes, as autoridades regulatórias e a comunidade científica a garantir que esses produtos atinjam os mais

altos padrões de qualidade no que diz respeito à eficácia e segurança (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), ao avaliar a introdução de uma vacina em um Programa Nacional de Imunização, três assuntos devem ser considerados: i) a importância da doença como prioridade de saúde pública, sua magnitude e a carga de doença; ii) segurança da vacina, eficácia/ efetividade e viabilidade de implementação; e iii) a capacidade do programa de imunização e do sistema de saúde em introduzir e manter com sucesso a vacinação em uma base regular (LOZE *et al.*, 2017). A segurança das vacinas, sua eficácia/ efetividade e consequentemente sua manutenção com base regular no sistema de saúde fazem parte, sobremaneira, do escopo de atuação da VISA.

A VISA é a parcela do poder do Estado destinada à defesa da saúde e tem por finalidade impedir que a saúde humana seja exposta a riscos e, em última instância, combater as causas dos efeitos nocivos, em razão de alguma distorção sanitária, na produção e na circulação de bens e na prestação de serviços de interesse à saúde. Portanto, o escopo de atuação da VISA está inserido no âmbito da prevenção e controle de riscos, proteção e promoção da saúde. Nesse sentido, atribui-se à VISA a tarefa de controlar riscos sanitários relacionados a um conjunto de bens, seus processos e ambientes, sejam produtos ou serviços, definidos no processo social como de interesse da saúde. Atua portanto, nas relações sociais de produção e consumo e tem sua dinâmica vinculada ao desenvolvimento científico tecnológico e a um conjunto de processos que perpassam o Estado, o mercado e a sociedade. As ações de VISA têm natureza essencialmente preventiva, não só dos danos, mas dos próprios riscos (COSTA, 2009).

Alinhado às exigências da OMS e do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) no que diz respeito à segurança das vacinas, o INCQS realiza ensaios de controle de qualidade em aproximadamente 1500 lotes de vacinas virais e bacterianas por ano. A potência e a termoestabilidade de algumas dessas vacinas virais se dá pela utilização de culturas celulares. Células Vero, provenientes de rim de macaco verde africano, são empregadas no controle das vacinas de febre amarela, dos componentes caxumba e sarampo e na vacina contra rotavírus. Células MA-104 (também de rim de macaco verde africano) podem ser empregadas no controle da vacina contra rotavírus. Para o componente rubéola, são utilizadas células RK-13, oriundas de rim de coelho. A linhagem Hep-2C de carcinoma de colo

de útero humano é preconizada para o controle da vacina oral contra poliomielite. Linhagens de pulmão de feto humano, como MRC-5 e WI-38 podem ser empregadas para o controle da vacina contra varicela e as análises de soros antirrábicos são realizadas em linhagem BHK-21 (rim de hamster).

### 1.3 Micoplasmas e culturas celulares

Os micoplasmas são contaminantes comuns de culturas de células eucarióticas. No início da década de 1990, o órgão estadunidense Food and Drug Administration (FDA) identificou 15% de contaminação por micoplasma após o exame de 20.000 culturas de células (ROTTEM; BARILE, 1993). Em 2002, Drexler e Uphoff relataram que 28% das 440 linhagens celulares testadas estavam contaminadas por esses microrganismos. Mais recentemente, um levantamento de dados transcriptômicos depositados no banco Gene Expression Omnibus (GEO) do NCBI mostrou que 11% dos depósitos referentes a primatas e roedores continham RNA identificável de micoplasmas (OLARERIN-GEORGE; HOGENESCH, 2015).

Micoplasmas foram inicialmente identificados em cultura de células em 1956, pela contaminação proposital, como parte da pesquisa e entendimento de sua própria biologia (RAZIN; HAYFLICK, 2010). Durante anos, a sua origem como contaminantes celulares foi incompreendida. Sabe-se, atualmente, que as principais fontes são o soro animal, a tripsina e aerossóis de culturas contaminadas. Há uma diferença significativa na frequência do isolamento de micoplasmas em células de linhagem (continuamente propagadas), culturas primárias (nunca subcultivadas) e aquelas subcultivadas apenas algumas vezes. Verifica-se que quanto mais subculturas, maior é a probabilidade da presença de micoplasmas. Esse fato é atribuído à maior exposição ao soro, tripsina e aerossóis (RAZIN; HAYFLICK, 2010; VOLOKHOV *et al.*, 2011). A expansão da aplicação de culturas de células eucarióticas em pesquisa e biotecnologia, aliada à constante troca entre os cientistas de linhagens não autenticadas e positivas para micoplasma, assim como ao uso crescente antibióticos na rotina – notadamente penicilina e estreptomicina, que servem apenas para mascarar, sem remover estes microrganismos – presumivelmente, levaram ao aumento da contaminação das culturas celulares por micoplasmas (DREXLER; UPHOFF, 2002).

Dentre os efeitos da contaminação por micoplasmas em culturas de células, destaca-se a alteração de muitas funções celulares, tais como: metabolismo celular, transdução de sinal, crescimento e apoptose, síntese de DNA e RNA. Além disso, o crescimento de vírus e a expressão proteica podem ser favorecidos ou desfavorecidos, o que os torna contaminantes indesejáveis, tanto em ambientes industriais quanto de pesquisa científica (DREXLER; UPHOFF, 2002). Micoplasmas animais são majoritariamente parasitas superficiais e não intracelulares, ao contrário dos mollicutes de insetos. No entanto, a localização intracelular foi demonstrada para *M. fermentans* e *M. penetrans*. É notório que a localização intracelular pode protegê-los dos efeitos do sistema imune do hospedeiro, assim como dos antibióticos e aumentar a dificuldade de sua erradicação de culturas de células infectadas, promovendo o estabelecimento de estados de infecção latentes ou crônicos (RAZIN; HAYFLICK, 2010).

#### **1.4 Controle de qualidade de produtos**

Classicamente, a viabilidade dos microrganismos é definida pela sua capacidade de formar colônias em meios de cultura sólidos ou de proliferarem em meios de cultura líquidos. A maioria dos testes efetuados até hoje nos laboratórios de controle microbiológico de produtos continua baseada nos métodos desenvolvidos por microbiologistas pioneiros como Louis Pasteur, Robert Koch e Joseph Lister, ou seja, fundamentam-se na diluição seriada e na recuperação de microrganismos usando meio de cultura estéril, sólido ou líquido (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010). Isso ocorre principalmente porque tais métodos, além de simples e pouco dispendiosos, podem ser muito eficientes e tem longa história de aplicação. As dificuldades em avaliar, validar e obter aprovação para implementar novas tecnologias em testes microbiológicos foram as principais barreiras para a adoção de métodos com potencial para substituir técnicas clássicas em microbiologia.

O ponto de partida da adoção de métodos microbiológicos alternativos pelas indústrias foi a força tarefa patrocinada pelo *Parenteral Drug Association* (PDA), numa representação conjunta de fabricantes de equipamentos, produtos farmacêuticos e correlatos, observadores de agências regulatórias e um comitê de especialistas em microbiologia analítica da Farmacopeia Americana (USP), cujo resultado foi o *PDA Technical Report n° 33: Evaluation, Validation and*

*Implementation of New Microbiological Testing Methods* (PARENTERAL DRUG ASSOCIATION, 2000). Esse relatório, certamente, influenciou a redação dos capítulos: *Alternative Methods for Control of Microbiological Quality* (ALTERNATIVE..., 2014) e *Validation of Alternative Microbiological Methods* (VALIDATION..., 2016) na Farmacopeia Europeia (Ph Eur) e USP, respectivamente. Como resultado dessas publicações, os métodos microbiológicos rápidos passaram a ser considerados pela indústria farmacêutica internacional e vêm sendo continuamente implementados (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

O primeiro passo para a regulação da detecção de micoplasmas em produtos biológicos e culturas celulares foi dado pelo FDA no ano de 1993 (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1993). A OMS, até os dias atuais, apresenta requerimentos muito semelhantes a essa primeira referência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). No que diz respeito aos métodos moleculares, a Farmacopeia Japonesa inovou em 2001, ao descrever pela primeira vez numa monografia compendial um método de análise baseado em amplificação de ácidos nucleicos (*nested-PCR*), tendo como alvo o *rrs* (MYCOPLASMA..., 2001). No ano de 2008, a Ph Eur publicou uma monografia sobre o controle de micoplasmas e a validação de métodos alternativos baseados na amplificação de ácidos nucleicos para detecção desse microrganismo em produtos biológicos (MYCOPLASMAS..., 2014). No entanto, os autores não descrevem o método de análise e se atém aos parâmetros pelos quais a metodologia alternativa deve ser validada. Em 2010, a USP descreveu, pela primeira vez, uma monografia específica sobre o controle de micoplasmas, porém com moldes muito semelhantes à monografia europeia, ou seja, sem descrever uma metodologia de análise (MYCOPLASMA..., 2016).

Com base nesses regulamentos, dois são os métodos recomendados para a detecção de micoplasmas em produtos biológicos: i) o cultivo, para concentrado viral, produto acabado a granel ou produto final e ii) a cultura de células indicadora, recomendada apenas para os bancos de células mestre, de trabalho, lote semente de vírus ou para culturas celulares utilizadas como controles. Em linhas gerais, o primeiro método, que se baseia na viabilidade do microrganismo, leva de 28 a 35 dias entre as subculturas preconizadas, necessita de até 7 controles positivos (*Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. pneumoniae* ou *M. fermentans*, *M. synoviae* e *Spiroplasma citri* ou *S. melliferum*), dependendo do tipo de produto e do fim ao qual se destina. Para esse ensaio, existe

a necessidade de meios de cultura específicos, com propriedades nutricionais suficientes para o crescimento de todos os controles e a demonstração da ausência de propriedades inibitórias do produto testado sobre o crescimento dos micoplasmas. Já a cultura de células indicadora necessita de apenas duas espécies (*M. hyorhinis* e *M. orale*), num tempo aproximado de 6 a 10 dias e se baseia na visualização da fluorescência do DNA corado pela comparação do produto aos controles (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1993; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; MYCOPLASMA..., 2001; MYCOPLASMAS..., 2014; MYCOPLASMA..., 2016).

A Farmacopeia Brasileira, atualmente em sua quinta edição (2010), não trata especificamente do controle de micoplasmas em produtos biológicos. A única recomendação sobre a pesquisa desses patógenos é feita para vacinas produzidas em linhagens primárias provenientes de embrião de aves, de forma que as granjas fornecedoras dos ovos devem demonstrar condições adequadas de produção em ambientes isentos de patógenos específicos. Nesse sentido, as aves devem ser monitoradas quanto a infecções causadas por retrovírus, vírus de Newcastle, vírus parainfluenza, vírus da varíola, vírus da encefalomielite, vírus da laringotraqueíte, vírus da reticuloendoteliose, vírus de Marek, adenovírus, vírus influenza, micobactérias, *Haemophilus paragallinarum*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* dentre outros agentes patogênicos de aves (VACINAS..., 2010).

Devido aos requerimentos nutricionais, o cultivo desses microrganismos tende a ser demorado e laborioso. Métodos de detecção de micoplasmas em culturas de células não baseados em cultura incluem marcadores de células, técnicas bioquímicas e imunológicas, coloração de DNA, microscopia eletrônica, hibridização, reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do gênero ou espécie específica (*end-point*, *nested*, *multiplex* e quantitativo), PCR associado ao ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) e até microarranjos. Embora cada um desses métodos possua suas vantagens, os procedimentos imunológicos são frequentemente limitados pela reatividade cruzada entre as espécies (DREXLER; UPHOFF, 2002; VOLOKHOV *et al.*, 2011).

Muitos métodos baseados em PCR têm sido propostos, ao longo dos anos, para a detecção de micoplasmas em culturas celulares. Boa parte deles tem como alvo a região conservada do *rrs* ou regiões intergênicas do rRNA 16S-23S

(TEYSSOU *et al.*, 1993; WIRTH *et al.*, 1994; VAN KUPPEVELD *et al.*, 1994; KONG *et al.*, 2001; UPHOFF; DREXLER, 2002; ELDERING *et al.*, 2004; SUNG *et al.*, 2006; DEUTSCHMANN; KAVERMANN; KNACK, 2010; YOUNG *et al.*, 2010; NIKFARJAM; FARZANEH, 2012; KAZEMIHA *et al.*, 2014; SALLING; BANG-CHRISTENSEN, 2016; JEAN *et al.* 2017). A estratégia da escolha dessas regiões reside na possibilidade da seleção de iniciadores com capacidade de detectar diferentes espécies de micoplasmas simultaneamente, excluindo amplificações inespecíficas com outros microrganismos não relacionados mollicutes e, principalmente, aos próprios substratos celulares.

Antes de sua implementação, os métodos alternativos devem passar por uma ampla avaliação a fim de demonstrar, entre outras capacidades, a de fornecer um limite de detecção comparável ou ainda melhor do que os métodos convencionais. Uma das maiores dificuldades da comparação entre métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos e na cultura de microrganismos é inerente à própria natureza dos analitos. Enquanto o método molecular detecta cópias de genoma (CG), o método clássico identifica unidades formadoras de colônia (UFC). Assim, é razoável inferir que culturas bacterianas contendo uma alta taxa CG/UFC, ou seja, apresentando uma baixa viabilidade, resultem numa falsa vantagem para os métodos moleculares (DREIER; STORMER; KLEESIEK, 2007; VOLOKHOV *et al.*, 2011). Dessa forma, fica evidente que a utilização de estoques de referência quantificados e com baixas taxas CG/UFC seja necessária para uma adequada avaliação do limite de detecção, assim como de outros parâmetros analíticos (DABRAZHNETSKAYA *et al.*, 2011; DABRAZHNETSKAYA *et al.*, 2013a).

## 1.5 Material de referência

A ISO/GUIA 30 de 2015 define material de referência (MR) como “material, suficientemente homogêneo e estável com respeito a uma ou mais propriedade especificadas, que foi estabelecido como sendo adequado para o seu uso pretendido em um processo de medição” (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2015). Esses materiais são geralmente utilizados como controles nos ensaios, para a construção das curvas de calibração e quantificação e na validação ou verificação dos métodos. Homogeneidade e estabilidade são duas características cruciais de qualquer MR. Nesse sentido, durante a preparação, todos

os esforços devem ser empregados para criar materiais tão homogêneos e estáveis quanto possível para um ou mais valores padrão. Uma das maiores dificuldades na produção de MR destinados a ensaios microbiológicos reside na própria natureza dos microrganismos, uma vez que as células são fortemente afetadas por variações de temperatura durante o processo de preservação que pode reduzir em muito sua viabilidade. O controle da homogeneidade visa garantir que os diferentes frascos do MR não apresentem diferenças significativas nos parâmetros a serem medidos. Além dos testes de homogeneidade, dois tipos de teste de estabilidade devem ser conduzidos: i) em longo prazo, que verifica a estabilidade do material em sua temperatura de armazenamento e ii) em curto prazo, que simula as condições de transporte e possíveis falhas na refrigeração durante a distribuição do material (LINSINGER *et al.*, 2001; ROSAS *et al.*, 2010).

O primeiro passo na produção de MR de micoplasmas foi dado pelo European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM): cepas de referência de *M. hyorhinis*, *M. synoviae*, *M. fermentans*, *M. orale* e *A. laidlawii* foram preparadas e avaliadas por cultivo num estudo colaborativo com seis laboratórios participantes. Esses padrões foram avaliados também, de forma preliminar, em ensaios moleculares (MILNE; DAAS, 2006). Materiais de referência importados com a quantificação CG determinada estão disponíveis para a avaliação da comparabilidade de métodos para a detecção de micoplasmas (DABRAZHNETSKAYA *et al.*, 2013b). No entanto, os custos são bastante elevados. O painel do ATCC com uma única ampola de cada um dos 10 micoplasmas sugeridos como contaminantes celulares (*A. laidlawii*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. hyorhinis*, *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. salivarium* e *M. synoviae*) quantificada para UFC e CG, custa aproximadamente 2.600 dólares para organizações sem fins lucrativos e mais de 3.000 dólares para organizações com fins lucrativos, sem contar os custos e a morosidade da importação (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2018).

Além disso, a alta variabilidade interlaboratorial e interensaios dos MR disponíveis para avaliação da contaminação por micoplasmas, tanto na medição de células vivas por cultura quanto na detecção de ácidos nucleicos por ensaios moleculares, levou a OMS à conduzir a produção e avaliação do primeiro padrão internacional para harmonizar ensaios para detecção de DNA de micoplasma

(NUBLING *et al.*, 2015). Nesse sentido, muitos avanços ainda são necessários nessa área de conhecimento.

Ensaio de citometria de fluxo baseados na discriminação entre células vivas e mortas são comumente aplicados em células procarióticas e eucarióticas. Características celulares como a integridade e a diferença de potencial da membrana celular, assim como diferentes vias metabólicas são as principais estratégias para avaliar a viabilidade em bactérias (EMERSON *et al.*, 2017). Na indústria, métodos baseados em citometria de fluxo têm sido propostos para a determinação de viabilidade e contagem de bactérias patogênicas em alimentos, bem como para fermentos lácticos e bactérias probióticas. A acurácia dessa metodologia tem sido sugerida como uma alternativa à cultura na produção de MR microbiológico, inclusive com maior grau de reprodutibilidade (MATSUOKA *et al.*, 2014; RAYMOND; CHAMPAGNE, 2014). Portanto, a avaliação da viabilidade de micoplasmas contaminantes de culturas celulares por citometria de fluxo pode ser uma ferramenta interessante na produção de MR microbiológico dessas bactérias, favorecendo assim o controle de qualidade de produtos biológicos e a comparação de métodos de detecção.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar metodologias tradicionais e alternativas para detecção, identificação e aferição da viabilidade de micoplasmas contaminantes em culturas celulares utilizadas na produção e controle de qualidade de produtos biológicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

#### **2.2.1 Estabelecimento de uma micoplasmoteca na Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária (CBRVS)**

- Desenvolver e implementar protocolos para o cultivo e estocagem das cepas de micoplasmas de referência recomendadas pelas farmacopeias americana e europeia para o controle de produtos biológicos e dos painéis internacionais para avaliação de métodos alternativos;
- Avaliar meios de cultura alternativos com vistas a simplificar e diminuir o número de meios necessários ao método de análise tradicional;
- Confirmar a identidade das cepas de referência incorporadas na CBRVS por sequenciamento nucleotídico.

#### **2.2.2 Aplicação de PCR de detecção em linhagens celulares**

- Avaliar o ensaio de detecção de micoplasmas por PCR desenvolvido e validado em Bio-Manguinhos/ Fiocruz para os produtos intermediários da vacina de febre amarela, frente aos microrganismos e culturas celulares do estudo;
- Avaliar a presença e ausência de micoplasmas em linhagens celulares cedidas por diferentes instituições e identificar a espécie contaminante por sequenciamento nucleotídico.

#### **2.2.3 Desenvolvimento de ensaio de citometria de viabilidade**

- Aplicar metodologias de marcação fluorescente para avaliação da viabilidade de uma espécie da Classe Mollicutes utilizando diferentes marcadores;
- Padronizar a metodologia desenvolvida e avaliar sua adequação a outras espécies da Classe Mollicutes incorporadas na CBRVS utilizando análise estatística.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Estabelecimento da micoplasmoteca de referência do INCQS

Cultivo e depósito de microrganismos da Classe Mollicutes de referência, relativos ao controle de qualidade de produtos, ao acervo da CBRVS.

##### 3.1.1 Aquisição dos microrganismos da Classe Mollicutes

Os microrganismos da Classe Mollicutes utilizados no presente trabalho foram adquiridos do *American Type Culture Collection* (ATCC) ou cedidas por pesquisadores e provedores de tecnologia, a saber:

*A. laidlawii* (ATCC 23206), *M. arginini* (ATCC 23838), *M. fermentans* (ATCC 19989), *M. gallisepticum* (ATCC 19610), *M. hominis* (ATCC 23114), *M. hominis* (ATCC 27545), *M. hyorhinae* (ATCC 17981), *M. pneumoniae* (ATCC 15531), *M. salivarium* (ATCC 23064), *M. synoviae* (ATCC 25204), *S. citri* (ATCC 27556) e *S. melliferum* (ATCC 33219) foram adquiridas diretamente do ATCC. *M. arthritidis* (ATCC 19611) e *M. pulmonis* (ATCC 19612) foram cedidas pelo professor Elmiro Rosendo do Nascimento da Universidade Federal Fluminense e *M. pneumoniae* (ATCC 15492), cedida pelo professor Jorge Timenetsky da Universidade de São Paulo. *A. laidlawii* (ATCC 14089), *M. gallisepticum* (ATCC 15302), *M. orale* (ATCC 23714) foram cedidas pelo Laboratório de Controle Microbiológico de Bio-Manguinhos/ Fiocruz.

As cepas de referência pertencentes à Classe Mollicutes foram cultivadas a partir de ampolas contendo pastilhas liofilizadas, a hidratação e inoculação foram realizadas conforme descrição do fornecedor nos meios indicados (Tabela 1); já as cepas cedidas foram recebidas em criotubos contendo glicerol. As passagens foram realizadas sempre em meios líquidos e sólidos e as leituras realizadas no terceiro, no quinto e no sétimo dia de incubação para avaliação da mudança da cor do meio ou mesmo sua turvação nos meios líquidos ou a formação de colônias características em formato de "ovos-fritos" nos meios sólidos. Nos meios líquidos foram realizados inóculos de 1 mL de cultura em 9 mL de meio. Já nos meios sólidos foram inoculados 200 µL em placas com 9 mL e o espalhamento realizado com auxílio de alças de Drigalsky.

Tabela 1 - Microrganismos de referência da Classe Mollicutes, meios de cultura e condições cultivo.

<b>Espécie</b>	<b>Identificação</b>	<b>Meio recomendado</b>	<b>Condições de cultivo</b>	<b>Fermenta glicose</b>
<i>A. laidlawii</i>	ATCC 14089	ATCC 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>A. laidlawii</i>	ATCC 23206	ATCC 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>M. arthritidis</i>	ATCC 19611	ATCC 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Não
<i>M. fermentans</i>	ATCC 19989	ATCC 243	37 °C - anaerobiose	Não
<i>M. gallisepticum</i>	ATCC 15302	ATCC 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>M. gallisepticum</i>	ATCC 19610	ATCC 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>M. hominis</i>	ATCC 23114	ATCC 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Não
<i>M. hominis</i>	ATCC 27545	ATCC 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Não
<i>M. hyorhinitis</i>	ATCC 17981	ATCC 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>M. orale</i>	ATCC 23714	ATCC 243	37 °C - anaerobiose	Não
<i>M. salivarium</i>	ATCC 23064	ATCC 243	37 °C - anaerobiose	Não
<i>M. arginini</i>	ATCC 23838	ATCC 484	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Não
<i>M. pneumoniae</i>	ATCC 15492	ATCC 988	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>M. pulmonis</i>	ATCC 19612	ATCC 988 ou 243	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>M. pneumoniae</i>	ATCC 15531	ATCC 2611	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>M. synoviae</i>	ATCC 25204	ATCC 2764	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>	Sim
<i>S. citri</i>	ATCC 27556	ATCC 668	30 °C - anaerobiose	Sim
<i>S. melliferum</i>	ATCC 33219	ATCC 798	32 °C - anaerobiose	Sim

Fonte: (Do autor, 2019).

As formulações dos meios de cultura recomendados pelo ATCC para cada uma das cepas de referência da Classe Mollicutes, assim como os meios recomendados pelas farmacopeias americana e europeia para controle destes microrganismos em produtos biológicos encontram-se descritas no Anexo 1.

### 3.1.2 Cultivo dos microrganismos da classe Classe Mollicutes em meio alternativo

Os microrganismos adicionados à CBRVS foram adaptados para cultivo em meio de Frey modificado (NASCIMENTO, 2000), que é um ajuste no meio de Frey original (FREY *et al.*, 1968), sendo composto por 22,5 g/L base caldo para micoplasma, 12 g/L glicose, 0,025 g/L vermelho de fenol e 25% (v/v) de suplemento. O suplemento consiste de 62,5 g/L extrato de levedura, 0,625 g/L NAD, 0,625 g/L

cisteína hidrocloreada, 30% (v/v) de soro equino e 30% (v/v) de soro suíno. Para os meios sólidos, adiciona-se 12 g/L de agarose. Os soros foram inativados a 56 °C por 30 min, o NAD e a cisteína foram misturados e mantidos à temperatura ambiente por 15 min antes de sua adição ao suplemento; o pH final foi ajustado para 7,8.

O meio de Frey modificado foi utilizado como meio alternativo no cultivo, em detrimento aos meios recomendados pelos ATCC, com o intuito de possibilitar o crescimento de todas as espécies de microrganismos da Classe Mollicutes incorporados na CBRVS. Após crescimento e estocagem em glicerol nos meios recomendados a cada uma das espécies, os micoplasmas de referência foram inoculados diretamente no meio alternativo (Frey modificado). As passagens foram realizadas em meios sólidos e líquidos conforme descrito no tópico 3.1.1.

### 3.1.3 Liofilização para conservação dos microrganismos

Depois de cultivadas no meio de Frey modificado e observadas colônias características, foram realizados inóculos em 30 mL de meio líquido e incubação até a mudança de coloração para as espécies fermentadoras de glicose e por 96 a 120 h para as espécies não-fermentadoras. As culturas foram centrifugadas por 45 min à 3.800xg e o precipitado foi ressuscitado em 15 mL solução de *skim milk* 15% (p/v).

Alíquotas de 500 µL da solução homogeneizada em *skim milk* foram dispensadas em ampolas de vidro e tampadas com algodão cardado estéril dentro da cabine de segurança biológica. A seguir, foram congeladas rapidamente em solução de etanol 92,7% e gelo seco e transferidas para ultra freezer a -80 °C por 48 h. Foi realizado o processo de liofilização no equipamento K 105 (Liotop) durante 24 h sob as condições de -40 °C e vácuo abaixo de 100 µmHg. As ampolas foram fechadas com um maçarico e a verificação de vácuo foi realizada pela utilização do aparelho emissor de centelha elétrica 2-12-8 (Tesla Coil). As ampolas foram armazenadas a -20 °C.

### 3.1.4 Controle de qualidade dos lotes de microrganismos da Classe Mollicutes incorporados na CBRVS

Como forma de controle de qualidade dos lotes produzidos, foram realizados ensaios de viabilidade, pureza e identidade.

#### *3.1.4.1 Viabilidade e pureza dos lotes de microrganismos da Classe Mollicutes produzidos*

A viabilidade e a pureza foram determinadas pelo crescimento característico em meio de Frey modificado (líquidos e sólidos) e ausência de contaminação em placas contendo ágar sangue de carneiro (Base para ágar sangue, MERCK).

Dois liófilos de cada lote foram ressuspensos individualmente com 1 mL de meio de Frey modificado líquido. Quinhentos microlitros foram diluídos seriadamente 10 e 100 vezes em meio de Frey modificado líquido. Alíquotas de 200 µL das diluições foram inoculadas em meio de Frey modificado sólido conforme item 3.1.1. O restante do volume ressuspensionado de cada ampola foi inoculado individualmente em placas contendo ágar sangue de carneiro pela técnica de esgotamento e incubadas por 37 °C por 96 h.

#### *3.1.4.2 Observação morfológica das culturas de microrganismos da Classe Mollicutes*

Foi realizado o registro fotográfico dos cultivos em meio sólido com aumento de 100X, utilizando o sistema Scope A1 e *software* Axio Vision, versão 4.9.1.0 (Carl Zeiss Microscopy).

#### *3.1.4.3 Identidade dos lotes de microrganismos da Classe Mollicutes produzidos*

Para confirmação da identidade, culturas líquidas provenientes das diluições de um dos liófilos submetidos ao teste de viabilidade foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA genômico extraído foi utilizado como molde em reações de PCR para amplificação parcial do *rrs*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 2. Os produtos de PCR foram amplificados utilizando a enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) em condições padrão: as reações de 50 µL foram aquecidas a 94 °C por 1 min e submetidas a 30 ciclos de: i)

desnaturação a 94 °C por 15 s; ii) anelamento a 55 °C por 30 s e iii) extensão a 68 °C por 90 s. Ao final da ciclagem foi realizada uma extensão final a 68 °C por 5 min.

Os produtos de PCR foram visualizados pela eletroforese de alíquotas de 10 µL da reação em géis de agarose 1,2% (p/v) em tampão Tampão Tris-borato EDTA (TBE) 1X contendo 2,5 µg/ mL de brometo de etídeo e fotografados sob luz ultra violeta. Depois de visualizados, os produtos de PCR foram então purificados usando o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) e a sua quantificação foi realizada por fluorimetria utilizando o equipamento Qubit (Thermo). Foram então submetidos ao sequenciamento nucleotídico pelo método de terminação de cadeia de Sanger.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o Kit Big Dye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 20 ng de produto de PCR purificado em cada reação. A eletroforese capilar foi realizada pela Plataforma de Sequenciamento Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) em sequenciador automatizado de DNA Applied Biosystems ABI Prism 3730. Ao todo, foram realizadas seis reações de sequenciamento por produto de PCR utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2, ou seja, duas com oligonucleotídeos utilizados na amplificação e quatro com oligonucleotídeos internos aos produtos apenas para o sequenciamento.

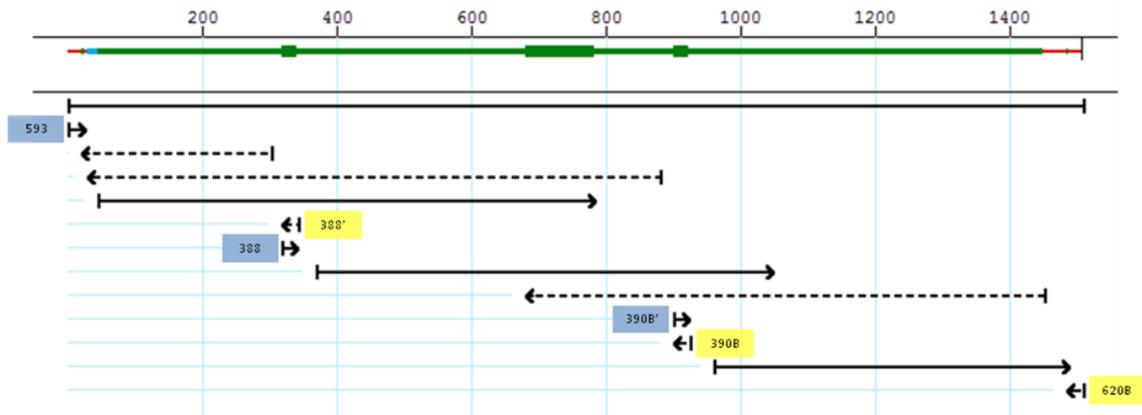
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento parcial do *rrs* dos microrganismos da Classe Mollicutes.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5'- 3'	Orientação	Posição no <i>rrs</i> de <i>M. gallisepticum</i> (Genbank CP006916.3: 313401-314935)	Referência
593	GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAACG	Senso	12-36	
388	CCARACTCCTACGGRAGGCAGC	Senso	330-351	PETTERSSON;
388'	GCTGCCTYCCGTAGGAGTYTGG	Anti-senso	330-351	UHLEN;
390B	CTTGTGCGGGYYCCCGTCAATTC	Anti-senso	913-935	JOHANSSON,
390B'	GAATTGACGGGRRCCCGCACAAG	Senso	913-935	1996
620B	GAAAGGAGGTRWTCCACYCSCAC	Anti-senso	1500-1522	

Fonte: (Do autor, 2019).

A estratégia de sequenciamento do fragmento do *rrs* dos microrganismos da Classe Mollicutes, amplificado com os oligonucleotídeos 593 e 620B, pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da estratégia de sequenciamento do fragmento do *rrs* de microrganismos da Classe Mollicutes.



Legenda: A linha cheia caracteriza a sequência consenso; as setas pequenas marcam os oligonucleotídeos iniciadores, senso em azul e anti-senso em amarelo. Os cromatogramas gerados por cada reação de sequenciamento estão simbolizados pelas setas cheias (senso) e tracejadas (anti-senso). Em vermelho a cobertura em apenas uma cadeia da dupla fita e em verde das duas. Fonte: (Do autor, 2019).

Para a montagem das sequências consenso, os cromatogramas foram analisados no *software* Seqman II (versão 7.0.0) da Lasergene. Cada sequência obtida foi comparada na plataforma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), frente ao banco de sequências do NCBI.

### 3.2 Aplicação do PCR para detecção de micoplasmas em linhagens celulares

Com o objetivo de observar a presença de contaminação por micoplasmas em linhagens celulares na cidade do Rio de Janeiro, a detecção de micoplasma por PCR foi empregada em culturas celulares cedidas por diferentes institutos de pesquisa e ensino.

#### 3.2.1 Microrganismos pertencentes à Classe Mollicutes

Para avaliar a sensibilidade de diferentes espécies da Classe Mollicutes aos métodos propostos foram utilizados DNA dos 18 microrganismos de referência

descritos no item 3.1.1. Os DNA dos microrganismos da Classe Mollicutes foram quantificados conforme descrito no item 3.1.4.3 e equalizados para 0,6 ng/  $\mu$ L pela diluição em água livre de nucleases.

### 3.2.2 Microrganismos não pertencentes à Classe Mollicutes

Conforme recomendação da PhEur (MYCOPLASMAS..., 2014), para avaliar a especificidade, foram selecionadas cepas-tipo de duas espécies representativas dos gêneros *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*: *C. difficile* CBRVS 00214 (ATCC 9689), *C. perfringens* CBRVS 00130 (ATCC 13124), *L. acidophilus* CBRVS 00076 (ATCC 4356), *L. rhamnosus* CBRVS 00006 (ATCC 7469), *S. agalactiae* CBRVS 00128 (ATCC 13813) e *S. pneumoniae* CBRVS 00360 (ATCC 33400).

Adicionalmente foram selecionadas as bactérias recomendadas pela Farmacopeia Brasileira para o teste de esterilidade (ENSAIOS..., 2010): *Bacillus subtilis* CBRVS 00001 (ATCC 6633), *Bacteroides vulgatus* CBRVS 00059 (ATCC 8492), *Clostridium sporogenes* CBRVS 00352 (ATCC 19404), *Escherichia coli* CBRVS 00033 (ATCC 25922) *Kocuria rhizophila* CBRVS 00010 (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* CBRVS 00230 (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* CBRVS 00039 (ATCC 6538).

Os microrganismos não pertencentes à Classe Mollicutes foram cultivados a partir de ampolas contendo pastilhas liofilizadas cedidas pela CBRVS, as etapas de hidratação e inoculação foram realizadas conforme descrição do fornecedor nos meios de cultura recomendados (Tabela 3). A extração do DNA genômico, a partir dos meios líquidos, e a sua quantificação foram realizadas conforme descrito no item 3.1.4.3. Os DNA das bactérias foram equalizados para 0,6 ng/  $\mu$ L pela diluição em água livre de nucleases.

Tabela 3 - Bactérias não pertencentes à Classe Mollicutes, meios de cultura e condições cultivo.

<b>Espécie</b>	<b>Identificação</b>	<b>Meio utilizado</b>	<b>Condições de cultivo</b>
<i>L. acidophilus</i>	CBRVS 00076	Man, Rogosa e Sharpe	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>
<i>L. rhamnosus</i>	CBRVS 00006	Man, Rogosa e Sharpe	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>
<i>B. vulgatus</i>	CBRVS 00059	Clostridial reforçado	37 °C - anaerobiose
<i>C. difficile</i>	CBRVS 00214	Clostridial reforçado	37 °C - anaerobiose
<i>C. perfringens</i>	CBRVS 00130	Clostridial reforçado	37 °C - anaerobiose
<i>C. sporogenes</i>	CBRVS 00352	Clostridial reforçado	37 °C- anaerobiose
<i>S. agalactie</i>	CBRVS 00128	Infusão de cérebro e coração	37 °C
<i>S. pneumoniae</i>	CBRVS 00360	Infusão de cérebro e coração	37 °C - 5% CO <sub>2</sub>
<i>B.subtilis</i>	CBRVS 00001	Tríptico de soja	30 °C
<i>E. coli</i>	CBRVS 00033	Tríptico de soja	37 °C
<i>K. rhizophila</i>	CBRVS 00010	Tríptico de soja	30 °C
<i>P. aeruginosa</i>	CBRVS 00230	Tríptico de soja	37 °C
<i>S. aureus</i>	CBRVS 00039	Tríptico de soja	37 °C

Fonte: (Do autor, 2019).

### 3.2.3 Culturas celulares eucarióticas

As 55 linhagens celulares avaliadas neste estudo foram gentilmente cedidas por quatro (04) diferentes instituições de ensino e pesquisa da cidade do Rio de Janeiro, que serão aqui identificadas pelas letras A, B, C e D, de modo a manter seu anonimato (Tabela 4). As células foram cedidas em criotubos contendo o respectivo meio de cultivo, suplementado ou não com crioprotetor. A extração de DNA genômico foi realizada de forma semelhante ao item 3.1.4.3.

Tabela 4 - Células eucarióticas avaliadas quanto à presença/ ausência de micoplasmas, número de identificação da amostra, tipo de linhagem, fonte biológica e Instituição provedora (continua).

<b>Número da Amostra</b>	<b>Linhagem celular</b>	<b>Fonte biológica</b>	<b>Instituição</b>
1	RK13	Coelho	A
2	Hep-2C	Humano	A
3	BHK-21	Hamster	A
4	RK13	Coelho	A
5	Vero	Macaco	A
6	MRC-5	Humano	A
7	MA-104	Macaco	A
8	SIRC	Coelho	A
9	L929	Camundongo	A
10	CHO-K1	Hamster	A
11	RK13	Coelho	A
12	Vero	Macaco	A
13	Vero	Macaco	A
14	THP-1	Humano	A
15	L-929	Camundongo	A
16	L-929	Camundongo	A
17	L-929	Camundongo	A
18	RK13	Coelho	A
19	RK13	Coelho	A
20	RK13	Coelho	A
21	HepG2	Humano	B
22	THP-1	Humano	B
23	Hep-2C	Humano	B
24	Huh7	Humano	B
25	THP-1	Humano	B
26	Huh7	Humano	B
27	C6/36	Inseto	B

Tabela 4 - Células eucarióticas avaliadas quanto à presença/ ausência de micoplasmas, número de identificação da amostra, tipo de linhagem, fonte biológica e Instituição provedora (conclusão)

28	THP-1	Humano	B
29	Hep-2C	Humano	B
30	THP-1	Humano	B
31	RK13	Coelho	A
32	THP-1	Humano	B
33	K-562	Humano	C
34	K-562	Humano	C
35	CHO-K1	Hamster	C
36	Vero	Macaco	C
37	Vero	Macaco	C
38	Hek 293	Humano	C
39	CHO-K1	Hamster	C
40	Hela	Humano	C
41	BJA-B	Humano	D
42	K562	Humano	D
43	RA 1	Humano	D
44	Raji	Humano	D
45	1F5	Camundongo	D
46	HEK 293	Humano	D
47	CHO-K1	Hamster	D
48	CHO/dhFr	Hamster	D
49	Sf9	Inseto	D
50	High Five	Inseto	D
51	293 Exp1	Humano	D
52	CHO-K1	Hamster	D
53	BHK-21	Hamster	D
54	MRC-5	Humano	D
55	CHO-K1	Hamster	D

---

Fonte: (Do autor, 2019).

### 3.2.4 PCR para detecção de micoplasmas

O ensaio de PCR para detecção de micoplasmas, descrito por LAWSON-FERREIRA e colaboradores (2016) foi testado quanto à capacidade de amplificar os microrganismos e células do estudo. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 5.

Ao todo, foram avaliados os DNA dos 18 diferentes microrganismos da Classe Mollicutes de referência descritos no item 3.1.1, as 13 bactérias não pertencentes a Classe Mollicutes descritas no item 3.2.2 e as 55 linhagens celulares eucarióticas descritas no item 3.2.3. Resumidamente as reações de PCR de 25 µL, utilizando o PCR Master Mix (Promega) e 0,6 µM de cada um dos nove oligonucleotídeos iniciadores foram aquecidas a 95 °C por 2 min e submetidas a 30 ciclos de: i) desnaturação a 95 °C por 30 s; ii) anelamento a 55 °C por 30 s e iii) extensão a 72 °C por 90 s. Ao final da ciclagem foi realizada uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados pela eletroforese em géis de agarose conforme descrito no item 3.1.4.3.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o ensaio de detecção de micoplasmas por PCR.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5'- 3'	Orientação	Posição no rrs de <i>M. gallisepticum</i> (Genbank CP006916.3: 313401-314935)	Referência
DSMZ-1	CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC	Senso	874-894	WIRTH <i>et al</i> , 1994
DSMZ-2	CGCCTGAGTAGTACGTACGC	Senso	874-894	
DSMZ-3	TGCCTGAGTAGTACATTCGC	Senso	874-894	
DSMZ-4	TGCCTGGGTAGTACATTCGC	Senso	874-894	
DSMZ-5	CGCCTGGGTAGTACATTCGC	Senso	874-894	
DSMZ-6	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC	Senso	874-894	
DSMZ-7	GCGGTGTGTACAAGACCCGA	Anti-senso	1361-1381	
DSMZ-8	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	Anti-senso	1361-1381	
DSMZ-9	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	Anti-senso	1361-1381	

Fonte: (Do autor, 2019).

### 3.2.5 Identificação da espécie contaminante por sequenciamento nucleotídico

O ensaio de PCR e sequenciamento de fragmento do *rrs* descrito no item 3.1.4.3 foi aplicado para todas as 55 linhagens celulares do estudo e aquelas que apresentaram amplificação apreciável de produto de PCR foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico, conforme item 3.1.4.3.

As sequências provenientes das contaminações foram depositadas na Plataforma GenBank do NCBI e comparadas na plataforma BLAST conforme descrito no item 3.1.4.3. Foi realizado um alinhamento Clustal W dessas sequências com todas as sequências dos microrganismos da Classe Mollicutes descritas no item 3.1.1. A análise filogenética foi realizada com o *software* Mega, versão 7.

### 3.2.6 Testes de amplificabilidade

Para confirmar a amplificabilidade dos DNA extraídos das bactérias não pertencentes a Classe Mollicutes e das linhagens celulares eucarióticas, foram realizados ensaios de PCR com oligonucleotídeos universais para o *rrs* bacteriano e para o *rrs* mitocondrial, respectivamente (Tabela 6). As reações de 25 µL foram realizadas utilizando o PCR Master Mix (Promega) em condições padrão: foram aquecidas a 95 °C por 2 min e submetidas a 30 ciclos de: i) desnaturação a 95 °C por 30 s; ii) anelamento a 55 °C por 30 s e iii) extensão a 72 °C por 90 s. Ao final da ciclagem foi realizada uma extensão final a 72 °C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados pela eletroforese em géis de agarose conforme descrito no item 3.1.4.3.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos iniciadores universais utilizados para confirmar a amplificabilidade do DNA de bactérias não pertencentes à Classe Mollicutes e linhagens celulares eucarióticas.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5'- 3'	Posição no rrs de <i>E. coli</i> (GenBank J01859)	Posição no rrs de mitocôndria humana		Referência
			(GenBank J01415)		
27 F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	08-27	-		LANE <i>et al</i> ,
1492 R	TACGGTTACCTTGTTACGACTT	1492-1513	-		1991
16S F	CCGCCTGTTTACCAAAAACAT	-	2490-2510		PALUMBI,
16S R	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	-	3059-3080		1996

Fonte: (Do autor, 2019).

### 3.3 Citometria de fluxo de viabilidade

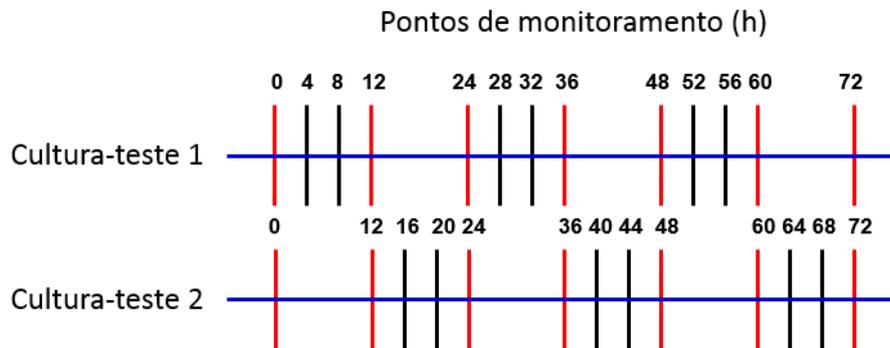
Com vistas ao estabelecimento de métodos rápidos e alternativos à cultura para avaliação da viabilidade de micoplasmas contaminantes de culturas de células, experimentos de citometria de fluxo foram conduzidos utilizando a cepa modelo *M. gallisepticum* CBRVS 00734 e, posteriormente, aplicados outras cepas incorporadas na CRBVS.

#### 3.3.1 Determinação da curva de crescimento de *M. gallisepticum* CBRVS 00734

Antes do início da padronização dos ensaios de citometria de fluxo de viabilidade, foi construída uma curva de crescimento para a cepa de *M. gallisepticum* CBRVS 00734 com intuito de entender melhor seus parâmetros de desenvolvimento no meio de Frey modificado. Foram preparadas duas culturas-teste, semelhantes e independentes, de 100 mL com 8 h de diferença no tempo de incubação para serem avaliadas periodicamente por plaqueamento.

Estas culturas-teste foram incubadas por um período total de 72 h e cada uma delas, avaliada em 13 diferentes tempos de incubação. Sete tempos de incubação foram comuns às duas culturas que permitiram construir a curva com intervalos de 4 h, conforme Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática da estratégia para construção da curva de crescimento de *M. gallisepticum* CBRVS 00734.



Legenda: As linhas horizontais em azul representam cada uma das duas culturas-teste e as barras verticais, os tempos de incubação onde foi realizado o monitoramento da quantidade de UFC/ mL, sendo as barras vermelhas os pontos de sobreposição dos resultados.

Fonte: (Do autor, 2019).

### 3.3.1.1 *Preparo das culturas-teste, diluição e plaqueamento*

A partir de uma cultura estoque congelada em 15% de glicerol foram realizados três pré-inóculos consecutivos de 300  $\mu$ L em 2,7 mL de meio de Frey modificado líquido. Cada pré-inóculo foi incubado a 37 °C por 24 h antes de dar origem ao próximo, de forma que o terceiro pré-inóculo, que deu origem ao início do experimento de avaliação da curva de crescimento, tivesse altíssima viabilidade. Sendo assim, o primeiro pré-inóculo foi realizado a partir da cultura estoque em glicerol e os dois seguintes a partir de culturas em andamento.

Duzentos microlitros do terceiro pré-inóculo foram distribuídos em 100 mL de meio de Frey modificado líquido, dando origem à cultura-teste que foi incubada a 37°C por 72 h e monitorada em tempos determinados. Todo o procedimento foi realizado em duplicata e com 8 h de diferença, dando origem a duas culturas-teste semelhantes, porém com diferentes tempos de incubação. Alíquotas de 500  $\mu$ L foram retiradas de cada cultura-teste e diluídas seriadamente de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  em PBS 1X para monitoramento da quantidade de UFC/ mL. Dez microlitros de cada uma das oito diluições decimais seriadas foram inoculadas em placas contendo meio de Frey modificado sólido.

### 3.3.1.2 Leitura e cálculo dos resultados

As leituras das placas foram realizadas ao fim de 72 h de incubação a 37% e 5% de CO<sub>2</sub> com auxílio de lupa com aumento de 40X. Para efeito de cálculo foram consideradas apenas as culturas das diluições que continham entre 30 e 300 colônias. A curva de crescimento foi construída com base no Log<sub>10</sub> do número de UFC/ mL das culturas-teste e o tempo de incubação correspondente. O tempo de geração foi calculado pelas expressões abaixo:

$$n = \frac{\log(N) - \log(N_0)}{\log(2)}$$

Onde:

n= número de gerações

N= número final de células

N<sub>0</sub>= número inicial de células

$$G = T/n$$

Onde:

G= tempo de geração

T= tempo de crescimento

n= número de gerações

### 3.3.2 Padronização da citometria de fluxo de viabilidade para a cepa de *M. gallisepticum* CBRVS 00734

As aquisições foram realizadas no citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter) num total de 5.000 eventos dentro da janela de marcação (*gate*), através do *software* CytExpert 1.1 (Beckman Coulter). Os dados das análises citofluorimétricas foram avaliados utilizando o *software* FlowJo (versão 7.6.5, LLC).

### 3.3.2.1 Preparo das amostras

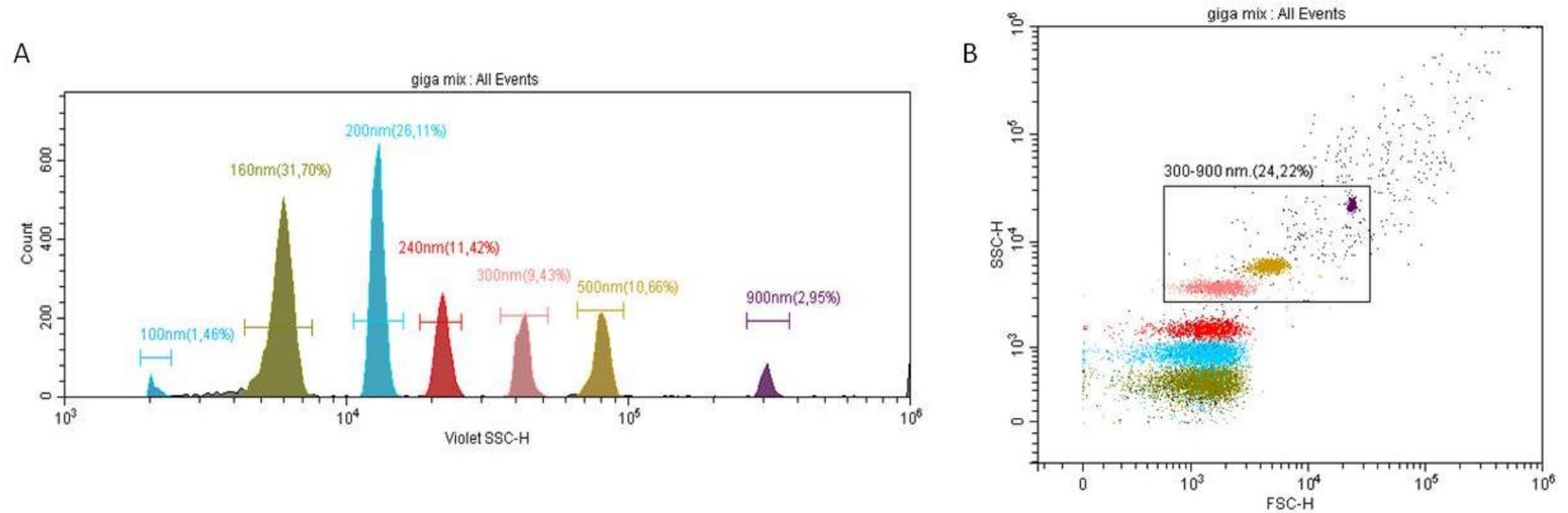
Com objetivo de diminuir a variabilidade experimental, criotubos contendo alíquotas de 1 mL de uma cultura de *M. gallisepticum* CBRVS 00734 com alta viabilidade foram preparados para citometria de fluxo, seguindo a estratégia dos pré-inóculos adotada no item 3.3.1.1 e foram congeladas a -80 °C em 15% de glicerol. Previamente à aquisição, as amostras foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo: todo o conteúdo de um criotubo de *M. gallisepticum* CBRVS 00734 com alta viabilidade foi inóculada em 30 mL de meio de Frey modificado líquido e incubado a 37 °C por 24 h. A partir da cultura foram realizadas duas lavagens em PBS 1X, ou seja, centrifugação a 16.000 xg durante 10 minutos e o volume ressuspendido em 1mL de PBS. Por fim, a quantidade de células foi estimada pela turbidez utilizando o equipamento Densicheck (BioMérieux) e diluída até 1 McFarland.

A cepa de *E. coli* (ATCC 25922) foi cultivada em caldo de soja trípico a 37°C durante 3 h sob agitação e utilizada como controle positivo de marcação para o CTC.

### 3.3.2.2 Separação celular por tamanho e morfologia

Primeiramente, as células de micoplasmas sem marcação fluorescente foram caracterizadas de acordo com sua morfologia (tamanho/ FSC–H vs. granularidade/ SSC–H) baseando-se na aquisição de bilhas (*beads*) com diferentes diâmetros (Megamix-Plus SSC – 160, 200, 240, 500 nm e Megamix-Plus FSC – 100, 300, 500 e 900 nm, ambas BioCytex). A partir do *dotplot* FSC–H vs. SSC–H, foi criado um *gate* abrangendo as *beads* com 300 a 900 nm de diâmetro, ou seja, tamanho correspondente às células de micoplasmas (Figura 3).

Figura 3 - Protocolo citofluorimétrico representativo das beads de tamanho definido Megamix-Plus SSC e Megamix-Plus FSC.



Legenda: (A) Histograma de granularidade (SSC-H violeta) apresentando picos relativos aos diâmetros das beads que variam entre 100 e 900 nm. (B) Dotplot de tamanho e granularidade (FSC-H vs. SSC-H) evidenciando o *gate* que envolve as *beads* com tamanho entre 300 a 900 nm.

Fonte: (Do autor, 2019).

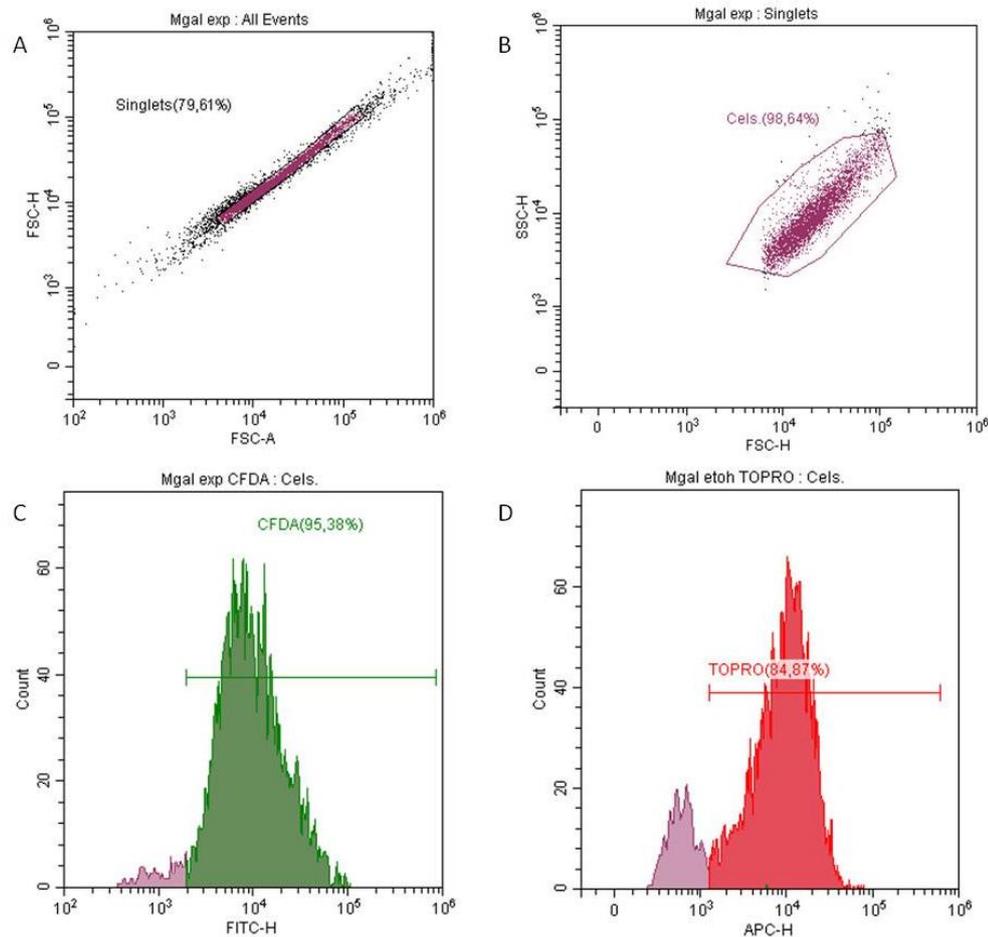
### 3.3.2.3 Marcação fluorescente

Para avaliação da viabilidade de *M. gallisepticum* CBRVS 00734 por citometria de fluxo, foram testados três diferentes marcadores fluorescentes: TO-PRO<sup>®</sup>3 Iodide (TOPRO), excitação/ emissão: 642/ 661 nm (Thermo Fisher Scientific); diacetato de 5-carboxifluoresceína (CFDA), excitação/ emissão: 495/ 520 nm e 5-cyano-2,3-di-(p-toluil) cloreto de tetrazólio (CTC) excitação/ emissão: 450/ 630 nm (ambos da Sigma-Aldrich). A marcação foi realizada pela incubação de diferentes concentrações de marcador a temperatura ambiente por 45 minutos. Após incubação, as células foram centrifugadas a 16.000 xg durante 10 min e ressuspensas em 500 µL de PBS para retirada de marcação no meio. As curvas de titulação variaram de 5 µM a 8 nM para TOPRO e CFDA e 1 a 0,25 mM para o CTC.

### 3.3.2.4 Aquisição e análise

As estratégias de aquisição e análise foram realizadas da seguinte forma: a exclusão dos *doublets* foi realizada pela criação de um *gate* de *singlets* num dotplot FSC–H vs. SSC–A (Figura 4A). A partir do *gate* de *singlets*, outro dotplot FSC vs. SSC foi criado para definir a morfologia dos micoplasmas, com base nas beads Megamix de tamanho definido (Figura 4B). Por fim, a viabilidade das células de micoplasmas foi determinada pela incorporação de fluorescência nos histogramas para CFDA (Figura 4C) e TOPRO (Figura 4D).

Figura 4 - Protocolo representativo da aquisição de micoplasmas vivos (CFDA+ e TOPRO<sup>neg</sup>) e mortos (CFDA<sup>neg</sup> e TOPRO+).



Legenda: (A) *Dotplot* FSC–H vs. FSC–A, para exclusão de *doublets* (*gate* de *singlets*); (B) *Dotplot* SSC–H vs. FSC–H mostrando células de micoplasma com base no *gate* de tamanho; (C) Histograma da intensidade de fluorescência (FITC–H) para incorporação positiva de CFDA por células de micoplasma vivas; (D) Histograma da intensidade de fluorescência (APC–H) para incorporação positiva de TOPRO por células de micoplasma mortas após a incubação com etanol.  
Fonte: (Do autor, 2019).

### 3.3.2.5 Estabelecimento do controle de morte

Para verificar a eficiência dos diferentes marcadores de viabilidade e identificar as melhores concentrações de uso, houve a necessidade de estabelecer um controle de morte celular. Para tanto, foram avaliados quatro diferentes agentes físico-químicos com capacidade de diminuir a viabilidade das culturas de micoplasmas: i) incubação em etanol 15% por 1 h, ii) incubação a 65 °C em banho-maria por 1 h, iii) incubação em dimetil-sulfóxido 3% por 1 h e iv) irradiação ultravioleta a 10.000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  por 10 min no equipamento UVC-515 Ultraviolet

Multilinker (Ultra-Lum). Os controles de morte foram avaliados de forma pareada com a mesma cultura sem tratamento, dita experimental (EXP), em todos os ensaios.

Maiores tempos de incubação também foram testados de forma a confirmar os resultados obtidos pelos controles de morte. Incubações de 24 e 72 h foram avaliadas para verificar a diminuição da viabilidade ao longo do tempo no crescimento *in vitro* em meios líquidos.

Paralelamente à citometria de fluxo, ensaios de contagem de UFC/ mL em meios de Frey modificado sólidos foram realizados para confirmar a perda da viabilidade nos ensaios para estabelecimento do controle de morte. Alíquotas de 100 µL foram diluídas seriadamente de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  em PBS 1X para monitoramento da viabilidade. Dez microlitros de cada uma das cinco diluições decimais seriadas foram inoculadas em duas réplicas. As leituras das placas foram realizadas conforme item 3.3.1.2.

### 3.3.3 Aplicação do método padronizado para *M. gallisepticum* a diferentes espécies da Classe Mollicutes

O protocolo de citometria de fluxo de viabilidade foi primeiramente otimizado para *M. gallisepticum* CBRVS 00734 e depois aplicado a outras espécies da Classe Mollicutes nas condições estabelecidas, ou seja, concentração de marcadores fluorescentes e controle de morte padronizados.

Pelo menos três experimentos independentes foram realizados para as cepas *A. laidlawii* CBRVS 00670, *M. arginini* CBRVS 00703, *M. hyorhinis* CBRVS 00701, *M. orale* CBRVS 00668 e *S. citri* CBRVS 00763. Todos os experimentos foram realizados tendo *M. gallisepticum* como controle.

As amostras de cada cepa foram preparadas conforme o item 3.3.2.1. Porém, tempos de incubação distintos foram empregados para cada espécie com base na experiência empírica do seu cultivo e depósito na CBRVS, a saber: 24 h para *A. laidlawii* CBRVS 00670, 48 h para *M. arginini* CBRVS 00703, 72 h para *M. hyorhinis* CBRVS 00701 e *S. citri* CBRVS 00763 e 144 horas para *M. orale* CBRVS 00668. A temperatura de incubação foi 30 °C para *S. citri* e 37 °C para as demais espécies.

### 3.3.4 Análise estatística dos resultados

Os resultados das porcentagens de células marcadas positivamente com TOPRO e CFDA nas condições tratado e não-tratado com etanol para os micoplasmas avaliados, bem como os valores de celularidade para *M. gallisepticum*, foram avaliados quanto normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. As médias dos resultados normais foram comparadas por teste de hipóteses t-student, enquanto as médias dos resultados não normais foram comparadas utilizando o teste Mann-Whitney. Para ambos os testes, foi aplicado nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ) em condição de bilateralidade. Todas as análises foram conduzidas no *software* R (versão 3.1.3, *Foundation for Statistical Computing*).

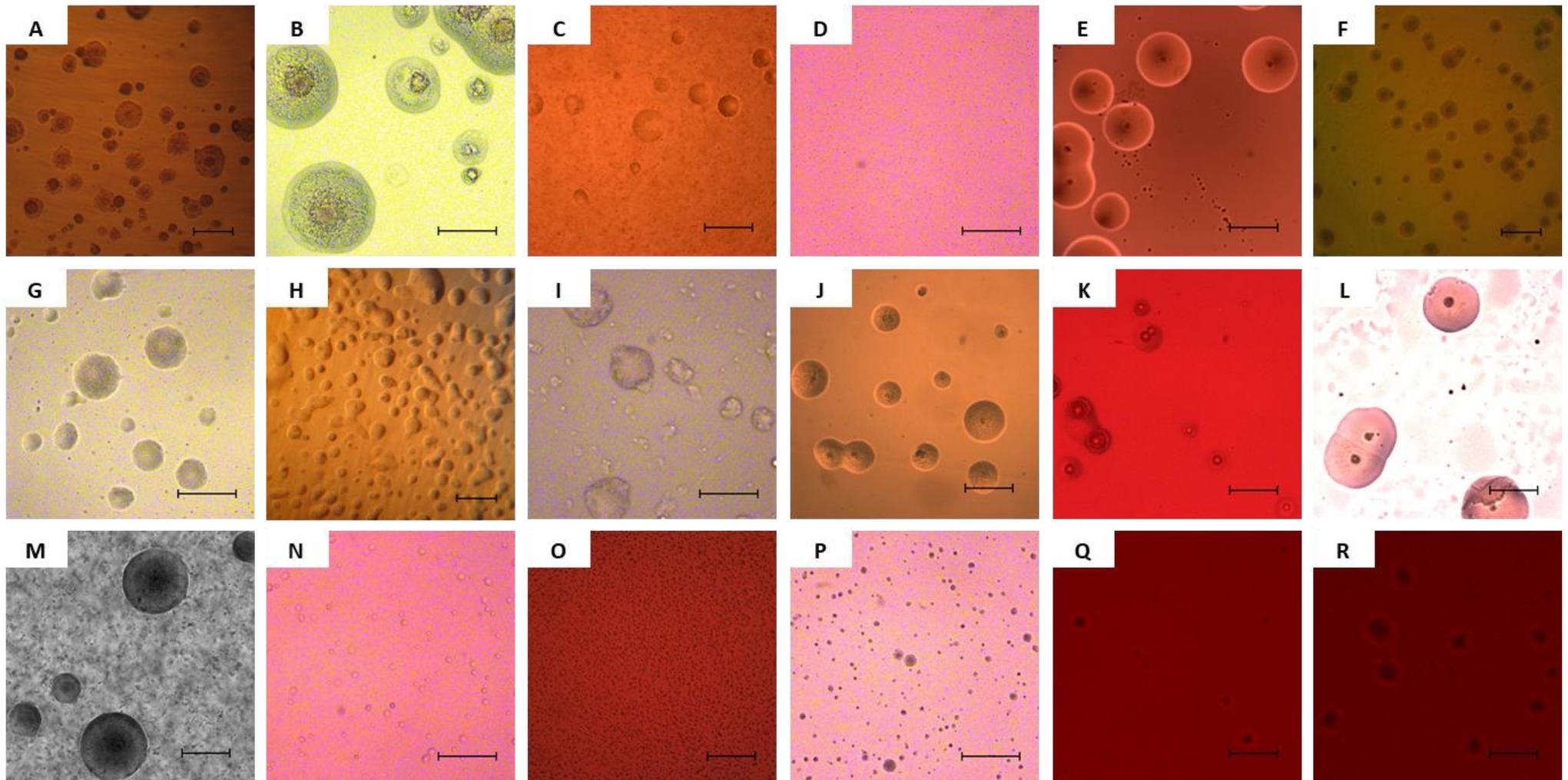
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Estabelecimento da micoplasmoteca de referência do INCQS

Todas as 18 cepas de microrganismos de referência da Classe Mollicutes estudadas, a saber: *A. laidlawii* (ATCC 14089), *A. laidlawii* (ATCC 23206), *M. arginini* (ATCC 23838), *M. arthritidis* (ATCC 19611), *M. fermentans* (ATCC 19989), *M. gallisepticum* (ATCC 15302), *M. gallisepticum* (ATCC 19610), *M. hominis* (ATCC 23114), *M. hominis* (ATCC 27545), *M. hyorhinae* (ATCC 17981), *M. orale* (ATCC 23714), *M. pneumoniae* (ATCC 15492), *M. pneumoniae* (ATCC 15531), *M. pulmonis* (ATCC 19612), *M. salivarium* (ATCC 23064), *M. synoviae* (ATCC 25204); *S. citri* (ATCC 27556) e *S. melliferum* (ATCC 33219) foram cultivadas com sucesso num único meio de cultura alternativo.

Estes microrganismos foram inicialmente cultivados no meio recomendado pelo ATCC, conforme Tabela 1. Em seguida, as propriedades nutritivas do meio de Frey modificado foram avaliadas. Esse meio de cultura se mostrou capaz de promover o crescimento das 18 cepas de micoplasmas estudadas. Foram, inclusive, evidenciadas colônias características em formato de "ovos-fritos" nos meios sólidos em todas as cepas, conforme pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Fotografias representativas dos diferentes microrganismos da Classe Mollicutes incorporados na CBRVS, cultivados em meio de Frey modificado sólido com aumento de 100X.



Legenda: (A) *A. laidlawii* (CBRVS 00670); (B) *A. laidlawii* (CBRVS 00761); (C) *M. arginini* (CBRVS 00703); (D) *M. arthritis* (CBRVS 00767); (E) *M. fermentans* (CBRVS 00716); (F) *M. gallisepticum* (CBRVS 00606); (G) *M. gallisepticum* (CBRVS 00734); (H) *M. hominis* (CBRVS 00533); (I) *M. hominis* (CBRVS 00736); (J) *M. hyorhinis* (CBRVS 00701); (K) *M. orale* (CBRVS 00668); (L) *M. pneumoniae* (CBRVS 00753); (M) *M. pneumoniae* (CBRVS 00534); (N) *M. pulmonis* (CBRVS 00768); (O) *M. salivarium* (CBRVS 00535), (P) *M. synoviae* (CBRVS 00735); (Q) *S. citri* (CBRVS 00763) e (R) *S. melliferum* (CBRVS 00762). As barras de escala equivalem a 50 μm.

Fonte: (Do autor, 2019).

Ao total, 27 lotes de microrganismos da Classe Mollicutes, contendo aproximadamente 30 ampolas liofilizadas/ cada, foram produzidos no meio de cultura alternativo e todos foram aprovados nos ensaios de viabilidade e pureza, ou seja, apresentaram crescimento característico em meios de Frey modificado líquidos e sólidos e não apresentaram qualquer contaminação no ágar sangue de carneiro. Cada uma das cepas de microrganismos da Classe Mollicutes incorporada na CBRVS recebeu um número de identificação como descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Identificação e quantidade de lotes produzidos para as cepas da Classe Mollicutes incorporadas na CBRVS.

<b>Espécie</b>	<b>Identificação ATCC</b>	<b>Identificação CBRVS</b>	<b>Quantidade de lotes produzidos</b>
<i>A. laidlawii</i>	14089	00670	2
<i>A. laidlawii</i>	23206	00761	1
<i>M. arginini</i>	23838	00703	2
<i>M. arthritidis</i>	19611	00767	1
<i>M. fermentans</i>	19989	00716	2
<i>M. gallisepticum</i>	15302	00606	2
<i>M. gallisepticum</i>	19610	00734	1
<i>M. hominis</i>	23114	00533	2
<i>M. hominis</i>	27545	00736	1
<i>M. hyorhinis</i>	17981	00701	2
<i>M. orale</i>	23714	00668	2
<i>M. pneumoniae</i>	15492	00753	2
<i>M. pneumoniae</i>	15531	00534	1
<i>M. pulmonis</i>	19612	00768	1
<i>M. salivarium</i>	23064	00535	2
<i>M. synoviae</i>	25302	00735	1
<i>S. citri</i>	27556	00763	1
<i>S. melliferum</i>	33219	00762	1

Fonte:(Do autor, 2019).

Todos os 27 lotes de microrganismos da Classe Mollicutes tiveram o fragmento do *rrs* obtido com os oligonucleotídeos 593 e 620B amplificado e sequenciado. As sequências consenso, montadas a partir da análise dos cromatogramas, foram comparadas na plataforma BLAST do NCBI e apresentaram identidade  $\geq 99\%$  e *e-value* = 0, entre sequências da mesma espécie depositadas no

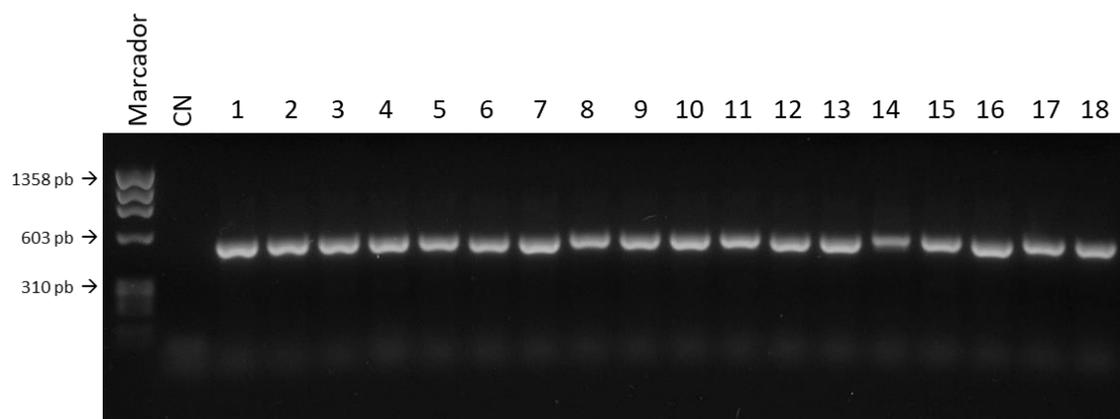
GenBank. Portanto, esta comparação sugere fortemente a identidade de todos os lotes de microrganismos da Classe Mollicutes produzidos.

Excetuando as sequências dos próprios oligonucleotídeos iniciadores, os produtos variaram entre 1.447 a 1.468 pb nas diferentes espécies estudadas, sendo a maior sequência proveniente de *M. hyorhinis* e as menores de *A. laidlawii*.

#### 4.2 Aplicação do PCR para detecção de micoplasmas em linhagens celulares

A especificidade do PCR para detecção de micoplasmas descrito no item 3.2.4 foi avaliada e alcançada com sucesso, ou seja, o ensaio foi capaz de amplificar positivamente os DNA dos 18 diferentes microrganismos da Classe Mollicutes. Nota-se, pela observação da Figura 6, que 3 ng de cada um dos 18 diferentes DNA em reações de PCR individuais de 25  $\mu$ L amplificaram fragmentos de aproximadamente 500 pb como esperado.

Figura 6 - Gel de agarose dos produtos de PCR amplificados pelo ensaio de detecção de micoplasmas a partir dos DNA das cepas da Classe Mollicutes incorporadas na CBRVS.

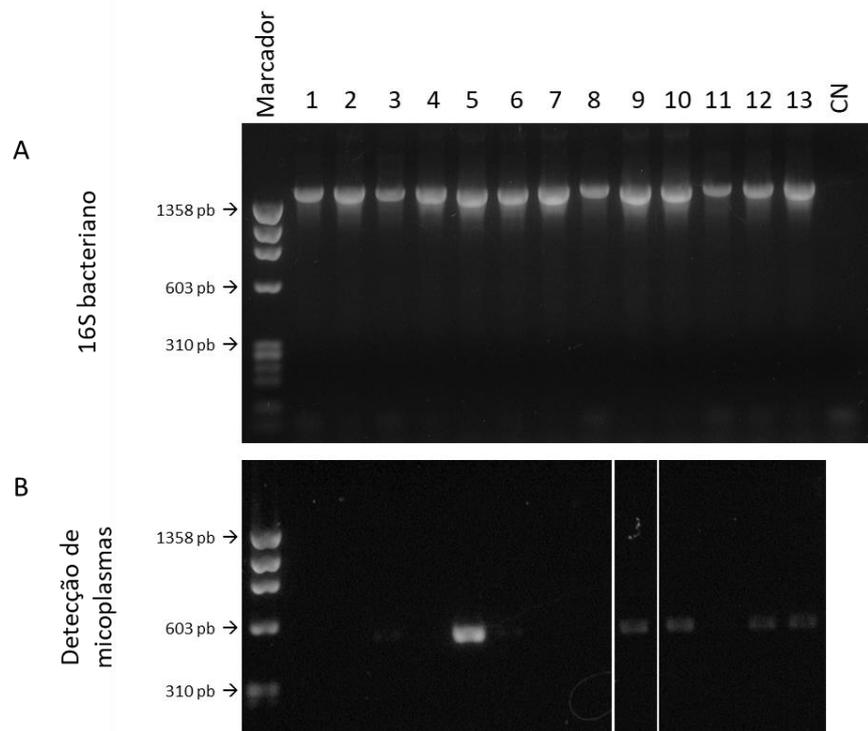


Legenda: Na primeira canaleta: o marcador de peso molecular  $\phi$ X 174 (Marcador); na segunda, o controle negativo (CN) e nas seguintes, as cepas incorporadas na CBRVS: (1) *A. laidlawii* (CBRVS 00670); (2) *A. laidlawii* (CBRVS 00761); (3) *M. arginini* (CBRVS 00703); (4) *M. arthritidis* (CBRVS 00767); (5) *M. fermentans* (CBRVS 00716); (6) *M. gallisepticum* (CBRVS 00606); (7) *M. gallisepticum* (CBRVS 00734); (8) *M. hominis* (CBRVS 00533); (9) *M. hominis* (CBRVS 00736); (10) *M. hyorhinis* (CBRVS 00701); (11) *M. orale* (CBRVS 00668); (12) *M. pneumoniae* (CBRVS 00753); (13) *M. pneumoniae* (CBRVS 00534); (14) *M. pulmonis* (CBRVS 00768); (15) *M. salivarium* (CBRVS 00535), (16) *M. synoviae* (CBRVS 00735); (17) *S. citri* (CBRVS 00763) e (18) *S. melliferum* (CBRVS 00762).  
Fonte:(Do autor, 2019).

A amplificabilidade dos 13 DNA extraídos das bactérias não pertencentes à Classe Mollicutes foi demonstrada com os oligonucleotídeos universais para o *rrs* bacteriano, Figura 7A. Foram utilizados 3 ng de DNA por reação de 25  $\mu$ L e todas as reações geraram produtos de PCR de aproximadamente 1500 pb, como esperado.

O teste de especificidade do PCR para detecção de micoplasmas descrito no item 3.2.4 foi realizado com 3 ng de cada um dos 13 diferentes DNA das cepas bacterianas não pertencentes à Classe Mollicutes em reação de 25  $\mu$ L individuais e evidenciou ampliações inesperadas. Pela observação da Figura 7B, é possível identificar a amplificação positiva de fragmentos de aproximadamente 500 pb para *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Figura 7 - Ilustração esquemática dos géis de agarose contendo os produtos de PCR amplificados a partir das cepas de bactérias não pertencentes à Classe Mollicutes.



Legenda: (A) Produtos de PCR gerados utilizando oligonucleotídeos universais para o *rrs* bacteriano e (B) Produtos gerados pelo ensaio de detecção de micoplasmas. Na primeira canaleta: o marcador de peso molecular  $\phi$ X 174 (Marcador); da segunda canaleta em diante, foram numerados os microrganismos: (1) *L. acidophilus*; (2) *L. rhamnosus*; (3) *B. vulgatus*; (4) *C. difficile*; (5) *C. perfringens*; (6) *C. sporogenes*; (7) *S. agalactiae*; (8) *S. pneumoniae*; (9) *B. subtilis*; (10) *E. coli*; (11) *K. rhizophila*; (12) *P. aeruginosa*; (13) *S. aureus* e por fim, o controle negativo (CN).

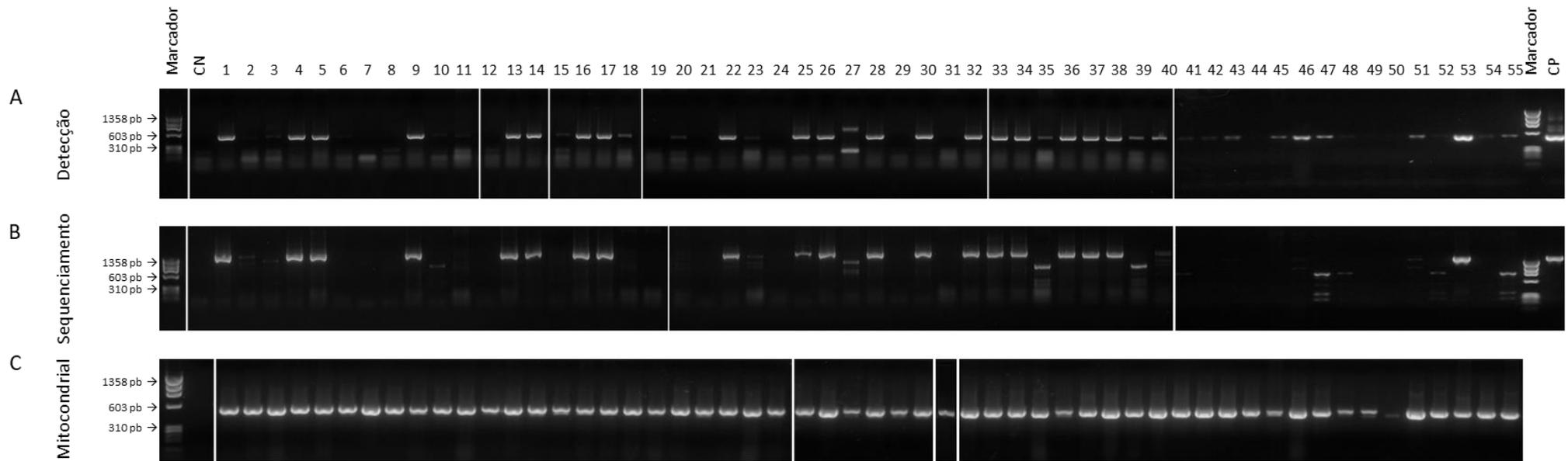
Fonte: (Do autor, 2019).

As 55 diferentes linhagens celulares provenientes das 4 diferentes instituições de pesquisa e ensino da cidade do Rio de Janeiro foram avaliadas quanto à presença de micoplasmas contaminantes utilizando o PCR para detecção descrito no item 3.2.4. Mais de setenta e oito por cento (78,18%) das linhagens celulares avaliadas foram consideradas positivas no PCR para detecção de micoplasmas (Figura 8A e Tabela 8). Foram negativas nesses ensaios apenas 12 (21,81%) das 55 linhagens. A amostra 27, uma linhagem C636, proveniente de células de *Aedes albopictus* apresentou ampliações inespecíficas neste ensaio e foi considerada negativa.

Paralelamente ao PCR de detecção, todas as linhagens foram avaliadas pelo PCR para o sequenciamento parcial do *rrs* dos microrganismos da Classe Mollicutes descrito no 3.1.4.3 e apenas 20 foram amplificadas positivamente com produtos apreciáveis nos géis de agarose (Figura 8B e Tabela 8) e foram submetidas às reações de sequenciamento. Dos 20 produtos, 19 foram eficientemente sequenciados e as sequências consenso, depositadas na plataforma Genbank do NCBI. Cada uma das 19 sequências recebeu um número de acesso particular. A amostra 25, que não foi corretamente sequenciada, por apresentar picos sobrepostos nos cromatogramas.

A amplificabilidade das 55 amostras de células eucarióticas foi demonstrada pelo ensaio de PCR com oligonucleotídeos para o *rrs* mitocondrial (Figura 8C e Tabela 8).

Figura 8 - Ilustração esquemática dos géis de agarose contendo os produtos de PCR amplificados a partir das células eucarióticas.



Legenda: (A) Produtos de PCR gerados pelo ensaio de detecção de micoplasmas; (B) Produtos gerados pelo PCR para o sequenciamento parcial do *rrs* dos microrganismos da Classe Mollicutes e (C) Produtos gerados pelo PCR para o *rrs* mitocondrial. Os números correspondem a cada uma das linhagens avaliadas no estudo, descritas no item 3.2.3, Tabelas 4 e 8. Marcador corresponde ao padrão de peso molecular  $\phi$ X 174; CN e CP, aos controles negativo e positivo, respectivamente.

Fonte: (Do autor, 2019).

Tabela 8 - Células eucarióticas avaliadas quanto a presença/ ausência de micoplasmas, número de identificação, tipo de linhagem, fonte da biológica, Instituição provedora, status da contaminação, espécie identificada por sequenciamento e número de acesso da sequência depositada no GenBank (continua)

Número da Amostra	Linhagem celular	Fonte biológica	Instituição	Contaminação por micoplasma	Espécie identificada (Acesso GenBank)
1	RK13	Coelho	A	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434446)
2	Hep-2C	Humano	A	Sim	Não sequenciado
3	BHK-21	Hamster	A	Sim	Não sequenciado
4	RK13	Coelho	A	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434447)
5	Vero	Macaco	A	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434448)
6	MRC-5	Humano	A	Sim	Não sequenciado
7	MA-104	Macaco	A	Não	Não se aplica
8	SIRC	Coelho	A	Não	Não se aplica
9	L929	Camundongo	A	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434449)
10	CHO-K1	Hamster	A	Sim	Não sequenciado
11	RK13	Coelho	A	Sim	Não sequenciado
12	Vero	Macaco	A	Não	Não se aplica
13	Vero	Macaco	A	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434450)
14	THP-1	Humano	A	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434451)
15	L-929	Camundongo	A	Sim	Não sequenciado
16	L-929	Camundongo	A	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434452)
17	L-929	Camundongo	A	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434453)
18	RK13	Coelho	A	Sim	Não sequenciado
19	RK13	Coelho	A	Não	Não se aplica
20	RK13	Coelho	A	Sim	Não sequenciado
21	HepG2	Humano	B	Não	Não se aplica
22	THP-1	Humano	B	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434454)
23	Hep-2C	Humano	B	Sim	Não sequenciado
24	Huh7	Humano	B	Não	Não se aplica
25	THP-1	Humano	B	Sim	Não sequenciado
26	Huh7	Humano	B	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434455)
27	C6/36	Inseto	B	Não	Não se aplica

Tabela 8 - Células eucarióticas avaliadas quanto a presença/ ausência de micoplasmas, número de identificação, tipo de linhagem, fonte da biológica, Instituição provedora, status da contaminação, espécie identificada por sequenciamento e número de acesso da sequência depositada no GenBank (conclusão)

28	THP-1	Humano	B	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434456)
29	Hep-2C	Humano	B	Não	Não se aplica
30	THP-1	Humano	B	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434457)
31	RK13	Coelho	A	Não	Não se aplica
32	THP-1	Humano	B	Sim	<i>M. arginini</i> (MK3434458)
33	K-562	Humano	C	Sim	<i>M. hyorhinis</i> (MK3434459)
34	K-562	Humano	C	Sim	<i>M. hyorhinis</i> (MK3434460)
35	CHO-K1	Hamster	C	Sim	Não sequenciado
36	Vero	Macaco	C	Sim	<i>M. hyorhinis</i> (MK3434461)
37	Vero	Macaco	C	Sim	<i>M. hyorhinis</i> (MK3434462)
38	Hek 293	Humano	C	Sim	<i>M. hyorhinis</i> (MK3434463)
39	CHO-K1	Hamster	C	Sim	Não sequenciado
40	Hela	Humano	C	Sim	Não sequenciado
41	BJA-B	Humano	D	Sim	Não sequenciado
42	K562	Humano	D	Sim	Não sequenciado
43	RA 1	Humano	D	Sim	Não sequenciado
44	Raji	Humano	D	Não	Não se aplica
45	1F5	Camundongo	D	Sim	Não sequenciado
46	HEK 293	Humano	D	Sim	Não sequenciado
47	CHO-K1	Hamster	D	Sim	Não sequenciado
48	CHO/dhFr	Hamster	D	Sim	Não sequenciado
49	Sf9	Inseto	D	Não	Não se aplica
50	High Five	Inseto	D	Não	Não se aplica
51	293 Exp1	Humano	D	Sim	Não sequenciado
52	CHO-K1	Hamster	D	Sim	Não sequenciado
53	BHK-21	Hamster	D	Sim	<i>M. orale</i> (MK3434464)
54	MRC-5	Humano	D	Sim	Não sequenciado
55	CHO-K1	Hamster	D	Sim	Não sequenciado

Fonte: (Do autor, 2019).

O alinhamento na plataforma BLAST das sequências provenientes dos micoplasmas contaminantes das linhagens celulares apresentou identidade  $\geq 99\%$  e *e-value* = 0 com sequências depositadas no GenBank, sugerindo *M. arginini* como contaminante das amostras 1, 4, 5, 9, 13, 14, 16, 17, 22, 26, 28, 29 e 32 provenientes das Instituições A e B; *M. hyorhinis* para as amostras 33, 34, 36, 37 e 38 da Instituição C e *M. orale* para a amostra 53 da Instituição D.

As sequências provenientes das linhagens celulares foram também alinhadas com as sequências das 18 cepas de microrganismos da Classe Mollicutes incorporadas na CBRVS pelo método Clustal W e a análise filogenética sugeriu fortemente a confirmação dos resultados do BLAST como pode ser evidenciado pela Figura 9.



### 4.3 Citometria de fluxo de viabilidade

Para padronização do ensaio de citometria de fluxo, foi inicialmente construída uma curva de crescimento de *M. gallisepticum* CBRVS 00734 para determinar sua fase exponencial de crescimento. A partir dos resultados das contagens provenientes das duas diferentes culturas-teste utilizadas para construir a curva, montou-se a Tabela 9.

Tabela 9 - Valores do Log10 das contagens de UFC/ mL nos diferentes pontos de monitoramento das duas culturas-teste.

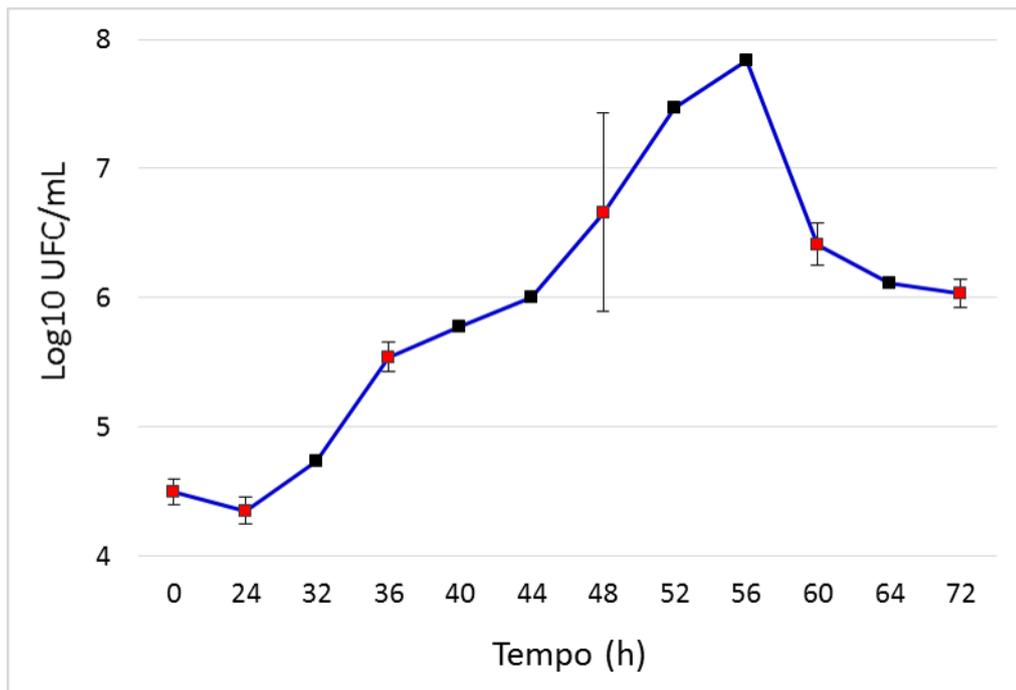
Tempo em horas	Cultura-teste 1 Log10(UFC/mL)	Cultura-teste 2 Log10(UFC/mL)
0	4,56	4,42
24	4,43	4,27
32	4,74	
36	5,45	5,62
40		5,77
44		6,00
48	6,11	7,20
52	7,46	
56	7,83	
60	6,53	6,30
64		6,11
68		6,79
72	5,95	6,11

Fonte: (Do autor, 2019).

O valor de Log10 (UFC/mL) no tempo de 0 h foi realizado pela contagem das placas referentes ao terceiro pré-inóculo, uma vez que os monitoramentos de UFC/ mL em ambas as culturas-teste só evidenciou colônias a partir de 24 h de incubação. A placa de meio de Frey modificado sólido referente ao tempo de 28 h da cultura-teste 1 contaminou com bactérias e, portanto foi desprezada. Com base nos resultados do Log10 do número de UFC/ mL foi construída a curva de crescimento, conforme Figura 10. O ponto de 68 h da cultura-teste 2 foi retirado da curva por se tratar de um valor aberrante.

Nota-se que a fase exponencial do crescimento está compreendida no período entre 24 e 56 h. O tempo de geração calculado no intervalo deste período foi de aproximadamente 3,2 horas. Portanto, para a padronização do ensaio de citometria de fluxo de viabilidade, foram utilizadas culturas com 24 h de cultivo, ou seja, no início da fase exponencial.

Figura 10 - Curva de crescimento experimental de *M. gallisepticum* CBRVS 00734.



Legenda: Em vermelho, as médias dos resultados comuns às duas culturas-teste com suas respectivas barras de erro; em preto, os resultados individuais de cada uma das garrafas-teste; em azul, a linha de tendência.

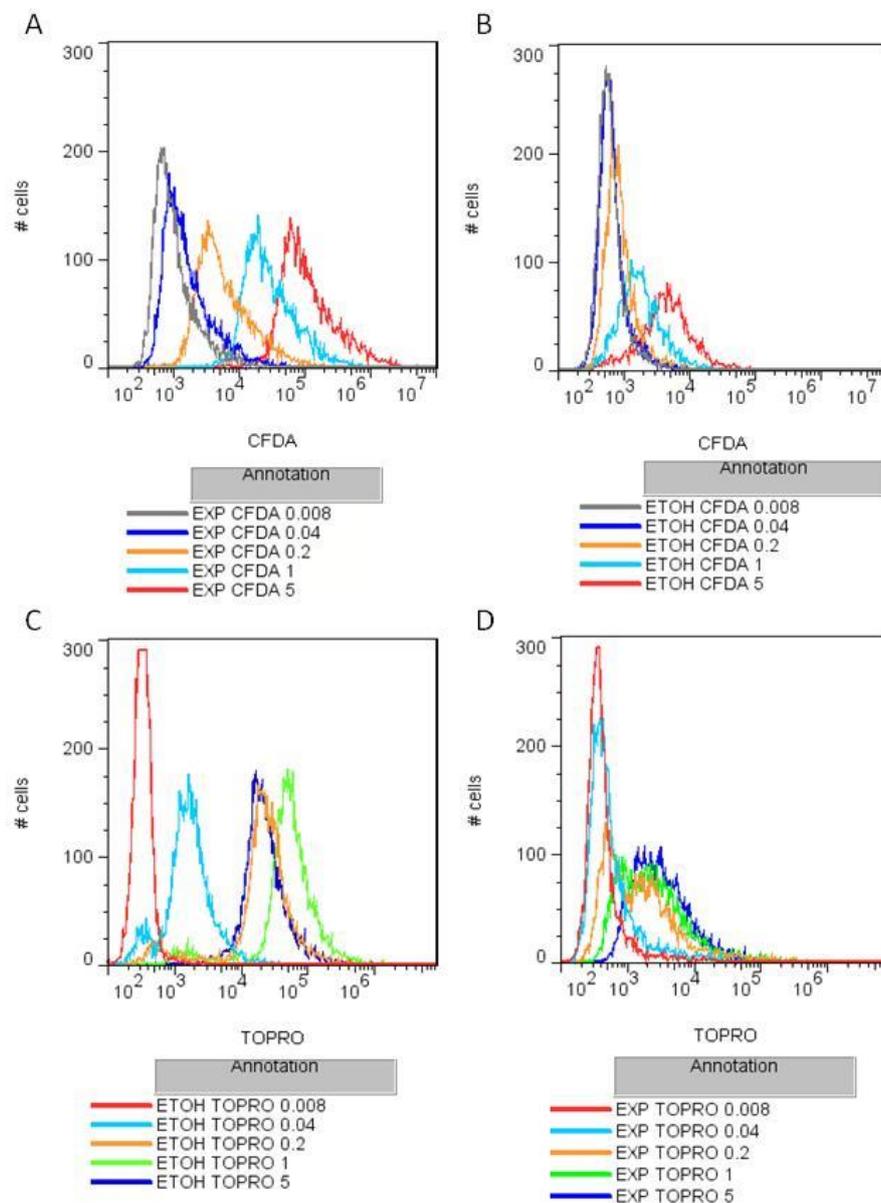
Fonte: (Do autor, 2019).

Foram realizadas curvas de titulação para os diferentes marcadores avaliados no estudo. Para avaliação das curvas foram utilizadas culturas de *M. gallisepticum* sem tratamento e incubados em etanol 15% por uma hora (controle de morte).

Para condição experimental (células viáveis), a incorporação de fluorescência de CFDA em *M. gallisepticum* variou de acordo com as concentrações testadas, ou seja, maior foi a incorporação na concentração 5  $\mu$ M deste marcador e menor em 8 nM (Figura 11A). No entanto, as culturas tratadas com etanol e marcadas com 5  $\mu$ M de CFDA mostraram marcação inespecífica, isto é, incorporação positiva em células mortas (Figura 11B). Portanto, 1  $\mu$ M foi a concentração de escolha para o marcador CFDA.

Analisando as curvas de titulação de TOPRO, pode-se observar que as três maiores concentrações (5, 1 e 0,2  $\mu\text{M}$ ) foram eficientes na marcação das células de *M. gallisepticum* tratadas com etanol (Figura 11C). Como nenhuma dessas três concentrações foi capaz de marcar positivamente células de *M. gallisepticum* viáveis, ou seja, em condição experimental (Figura 11D), foi selecionada a concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  para TOPRO.

Figura 11 - Imagem esquemática de sobreposição (*overlay*) da titulação dos marcadores de viabilidade em células de *M. gallisepticum*.

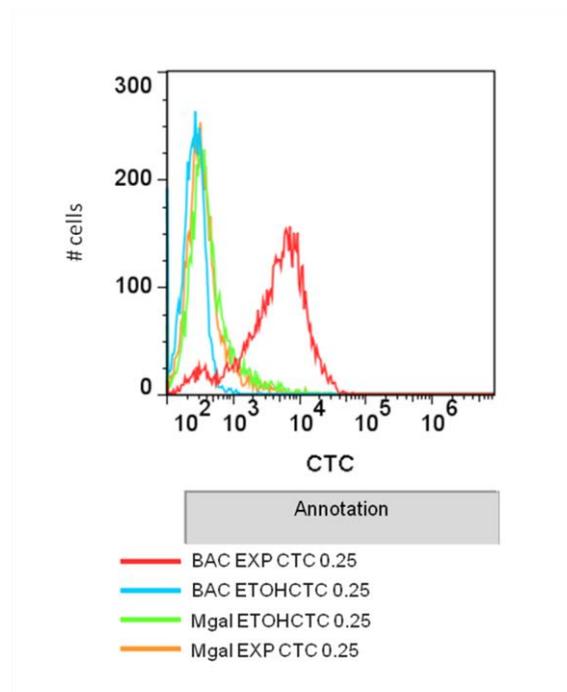


Legenda: (A) Incorporação de fluorescência de CFDA na condição experimental, (B) CFDA no controle de morte, (C) Incorporação de fluorescência de TOPRO no controle de morte e (D) TOPRO em condição experimental.

Fonte: (Do autor, 2019).

Não houve incorporação positiva de fluorescência em *M. gallisepticum* em nenhuma das concentrações de CTC avaliadas. Para as células de *E. coli* que foram utilizadas como controle positivo da marcação, a melhor concentração que foi positivamente incorporada na condição experimental foi 0,25 mM (Figura 12).

Figura 12 - Imagem esquemática do *overlay* da incorporação de fluorescência de CTC.



Legenda: Células de *E. coli* (BAC), *M. gallisepticum* (Mgal), tratadas (ETOH) e não-tratadas (EXP) com etanol.

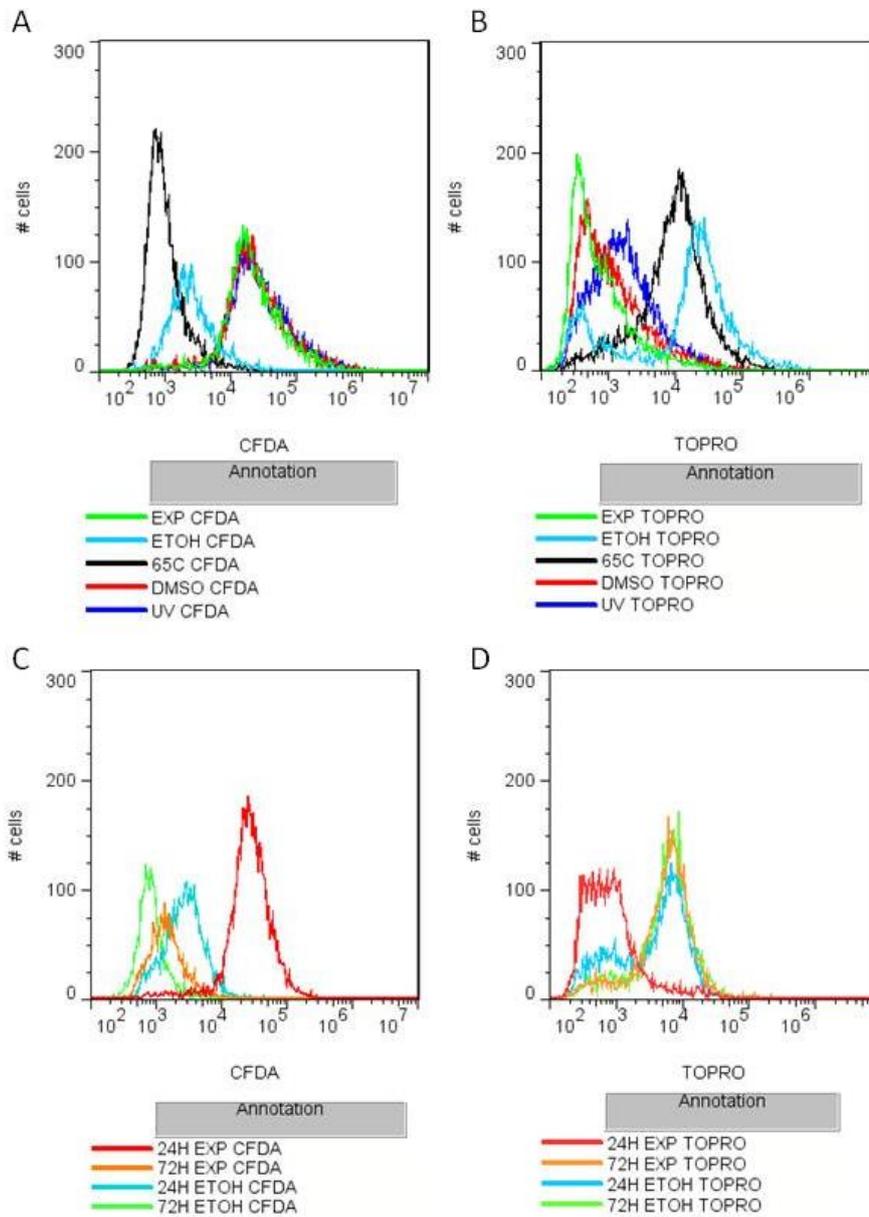
Fonte: (Do autor, 2019).

Diferentes tratamentos para a diminuição intencional da viabilidade de células de *M. gallisepticum* foram avaliados com o objetivo de estabelecer um controle de morte efetivo para os marcadores de viabilidade testados neste trabalho. As quatro condições iniciais de morte (etanol 15%, 65° C, dimetilsulfóxido 3% e irradiação ultravioleta) foram comparadas com células não-tratadas (condição experimental), tanto para CFDA (Figura 13A) quanto para TOPRO (Figura 13B). Foi observado, em ambos os marcadores, que a maiores perdas de viabilidade ocorreram pelo tratamento das células de micoplasma por aquecimento a 65 °C e incubação em etanol 15%. No entanto, o aquecimento levou a uma maior redução da celularidade,

ou seja, da quantidade de células por microlitro medida pelo equipamento (Tabela 10).

Para confirmar os resultados do controle morte utilizando agentes físico-químicos, culturas de *M. gallisepticum* foram cultivadas por maiores períodos para induzir a morte por senescência. A Figura 13C (CFDA) e 13D (TOPRO) mostra culturas incubadas por 24 e 72h, tanto em condição experimental quanto tratadas com etanol. Observa-se incorporação positiva de fluorescência de CFDA apenas na cultura incubada por 24 h em condição experimental. Quanto à marcação por TOPRO, podemos observar a incorporação positiva na cultura incubada por 72 h e em ambas tratadas com etanol. Isso sugere o aumento da população de células mortas no maior período de incubação.

Figura 13 - Imagem esquemática do *overlay* dos diferentes tratamentos de morte celular avaliados para células de *M. gallisepticum*.



Legenda: experimental (EXP), incubação com etanol (ETOH), aquecimento (65), dimetilsulfóxido (DMSO) e irradiação ultravioleta (UV) marcada com (A) CFDA e (B) TOPRO. Culturas cultivadas por 24 e 72 horas, tanto nas condições: experimental (EXP) e controle de morte (ETOH) marcadas com (C) CFDA e (D) TOPRO.

Fonte: (Do autor, 2019).

Tabela 10 - Resultados da contagem absoluta de células realizada pelo Cytoflex nas diferentes condições de morte celular avaliadas para estabelecimento do controle de morte.

Condição	Quantidade de eventos por microlitro
Experimental	563
Etanol	491
DMSO	778
Ultravioleta	612
Aquecimento	128

Fonte: (Do autor, 2019).

Os resultados de contagem em placa corroboram a redução de viabilidade observada nos experimentos de citometria de fluxo para o estabelecimento do controle de morte. Tanto a incubação em dimetilsulfóxido quanto a irradiação ultravioleta diminuíram aproximadamente 1 Log<sub>10</sub> da condição experimental sem tratamento (~ 8x10<sup>5</sup> UFC/ mL), enquanto o aquecimento e a incubação em etanol inibiram completamente o crescimento de *M. gallisepticum* no meio sólido. Para os diferentes tempos de incubação, observou-se a redução de 2 Log<sub>10</sub> a partir de 24 h (~ 2x10<sup>5</sup> UFC/ mL) a 72 h (~ 3x10<sup>3</sup> UFC/ mL). Após o tratamento com etanol, apenas uma colônia foi vista na placa referente à cultura incubada por 24 h.

A fim de verificar se o protocolo padronizado para *M. gallisepticum* poderia ser aplicado com sucesso a outras espécies de micoplamas, as condições estabelecidas no ensaio de citometria de viabilidade foram empregadas em *M. arginini*, *M. hyorhinis*, *M. orale*, *S. citri* e *A. laidlawii*. Em todas as espécies testadas, a redução da viabilidade foi claramente observada, nas porcentagens de células marcadas positivamente com CFDA, entre a condição experimental e o controle de morte, alcançando significância estatística ( $p < 0,025$ ) para *M. gallisepticum*, *M. hyorhinis*, *S. citri* e *A. laidlawii* (Tabela 11, Figura 14A). No entanto, foi percebida uma baixa incorporação deste marcador em células de *M. arginini* (Figura 14A). Na marcação com TOPRO, o maior destaque foi atribuído às células de *A. laidlawii* que apresentam uma porcentagem maior de células positivamente marcadas na condição experimental do que nas células tratadas com etanol, ao contrário do esperado. Para as outras espécies, a redução das porcentagens de células positivas para TOPRO se mostraram evidentes entre a condição experimental e o controle de

morte, com diferença estatística ( $p < 0,025$ ) para as espécies *M. gallisepticum*, *M. hyorhinae* e *S. citri* (Tabela 11, Figura 14B).

Nos experimentos com *M. orale*, o resultado das marcações ocorreu conforme esperado, ou seja, foi observada a diferença das porcentagens de positividade entre as condições experimental e de controle de morte para ambos os marcadores. No entanto, grande quantidade de células mortas foi observada já na condição experimental, levando a uma pequena redução percentual.

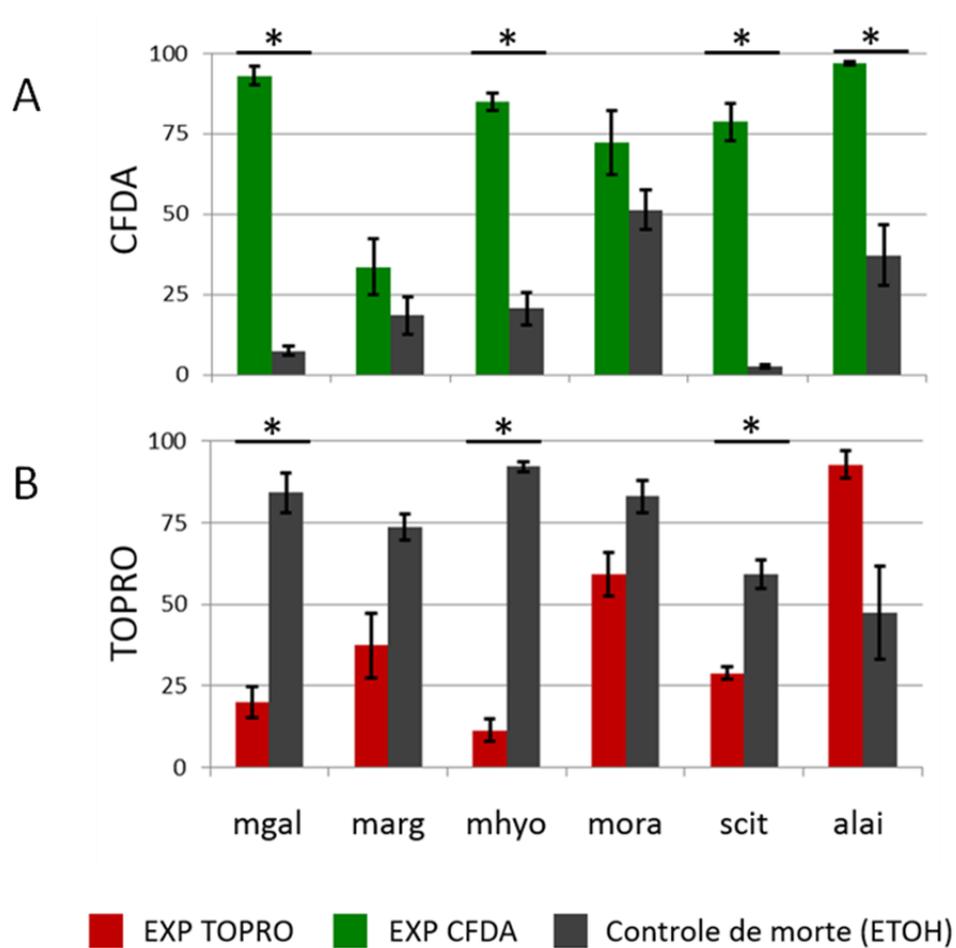
Nas médias dos experimentos realizados com as espécies *M. gallisepticum* e *M. hyorhinae*, os resultados percentuais do número de células foram complementares entre os dois marcadores, ou seja, a soma das porcentagens de células viáveis e mortas avaliadas com os dois diferentes marcadores variou entre 94 e 112%, tanto na condição experimental quanto no controle de morte. A dupla marcação foi testada para *M. gallisepticum*, porém a marcação com CFDA pareceu interferir na marcação de TOPRO, diminuindo-a (dados não mostrados).

Tabela 11 - Valores de P obtidos na comparação da redução das médias percentuais de viabilidade entre a condição tratado e não-tratado com etanol para os marcadores TOPRO e CFDA.

<b>Espécie</b>	<b>p-Valor TOPRO</b>	<b>p-Valor CFDA</b>
<i>M. gallisepticum</i>	1,5E-05	2,1E-03
<i>M. arginini</i>	0,051	0,232
<i>M. hyorhinae</i>	1,2E-06	0,014
<i>M. orale</i>	0,035	0,166
<i>S. citri</i>	3,1E-03	8,5E-04
<i>A. laidlawii</i>	0,076	0,023

Fonte: (Do autor, 2019).

Figura 14 - Histogramas mostrando as médias das porcentagens de células positivamente marcadas nas diferentes espécies.



Legenda: *M. gallisepticum* (mgal), *M. arginini* (marg), *M. hyorhinis* (mhyo), *M. orale* (mora), *S. citri* (scit) e *A. laidlawii* (alai). As médias  $\pm$  EP são mostrados em (A) para CFDA e em (B) para TOPRO em condições experimentais (EXP) e controle de morte (ETOH). Os asteriscos identificam diferença estatística entre a condição experimental e o controle de morte para cada espécie/ marcador.

Fonte: (Do autor, 2019).

No que diz respeito à celularidade de *M. gallisepticum*, utilizado como controle nos experimentos para avaliar a aplicabilidade do ensaio citofluorimétrico às demais espécies da Classe Mollicutes, foi observado que a incubação em etanol reduziu em média 80% da quantidade de eventos por microlitro quando comparada à condição experimental. O teste estatístico de Mann-Whitney corroborou essa redução ( $p < 0,025$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Um dos maiores obstáculos à pesquisa e investigação dos micoplasmas em laboratório e seu correto diagnóstico tem sido, historicamente, a dificuldade de cultivá-los (RAZIN, 2010; VOLOKHOV *et al*, 2011). Portanto, a proposta deste trabalho foi avaliar metodologias clássicas e alternativas para detecção de micoplasmas em culturas celulares, de forma a gerar conhecimento na área, que possa ser utilizado na análise de contaminação de linhagens celulares utilizadas em ensaios de controle da qualidade de produtos biológicos sujeitos a VISA.

As dificuldades encontradas na aquisição de cepas de microrganismos de referência no mercado internacional, devido aos altos custos e à morosidade nos processos de importação, levaram o INCQS a investir na autossuficiência nacional no que diz respeito à produção e fornecimento de microrganismos utilizados em ensaios de controle da qualidade de produtos de acordo com metodologias preconizadas em compêndios oficiais. A CBRVS é uma coleção de serviço que mantém em seu acervo cerca de 800 linhagens bacterianas. Seus principais objetivos são: adquirir, autenticar, produzir, preservar e distribuir bactérias. Essa coleção funciona também como um centro de pesquisa e treinamento em caracterização taxonômica e preservação de bactérias. Todas as 18 diferentes cepas de microrganismos de referência da Classe Mollicutes estudadas foram cultivadas com sucesso no meio de Frey modificado alternativo e incorporadas na CBRVS. A adaptação do crescimento das cepas de referência estudadas num único meio de cultura, em oposição às sete formulações sugeridas pelo ATCC ou às três recomendadas pela farmacopeia europeia (Anexo 1), apresenta vantagens no que diz respeito aos custos e mão-de-obra no cultivo destes microrganismos. Em contrapartida, não foi realizada qualquer inferência sobre as alterações proteômicas que o crescimento no meio alternativo possa ter causado nessas bactérias. Uma vez que a fisiologia das células cultivadas *in vitro* depende diretamente das condições externas, notadamente dos nutrientes presentes ou ausentes no meio de cultura, é razoável supor que alterações proteômicas, e não somente metabólicas, possam ter sido ocasionadas nos micoplasmas incorporados na CBRVS pelo cultivo em meio de Frey modificado. Dalzon e colaboradores (2016) relataram que a alteração do meio de cultura induz mais modificações no proteoma de macrófagos do que as respostas dessas células a nanopartículas de baixa toxicidade (dióxido de titânio e dióxido de

zinco). Esse estudo apontou que as classes de proteínas moduladas pela mudança de meio vão muito além do metabolismo e que proteínas estruturais, como aquelas associadas ao citoesqueleto, bem como a vias de sinalização, também são moduladas pela composição do meio de cultura. Nesse sentido, a adaptação do crescimento dos micoplasmas incorporados na CBRVS pode ter ocasionado modificações nas células bacterianas, mas dificilmente essas alterações influenciaram a utilização desses microrganismos como cepas de referência em estudos genômicos ou de viabilidade, como por exemplo, a citometria de fluxo. No entanto, mais estudos devem ser conduzidos para entender quais modificações podem ter ocorrido (ou não) pelo cultivo em meio de cultura diverso do recomendado.

Em se tratando, especificamente, do controle de produtos biológicos, a vantagem da utilização de um único meio de cultura para o teste de detecção de micoplasmas é ainda maior, uma vez que o número de ensaios necessários para cada lote de produto diminui. De acordo com a Ph Eur, outros meios de cultura podem ser utilizados no controle de produtos biológicos em detrimento das formulações recomendadas desde que sejam capazes de promover o crescimento dos micoplasmas pesquisados (MYCOPLASMAS..., 2014). Nesse sentido, o meio de Frey modificado avaliado nesse estudo apresenta-se como uma alternativa promissora que pode ser diretamente aplicada no controle de qualidade de produtos biológicos.

Devido à clara associação de micoplasmas às culturas celulares, o ensaio de detecção de micoplasmas por PCR desenvolvido e validado em Bio-Manguinhos/Fiocruz para os produtos intermediários da vacina de febre amarela (LAWSON-FERREIRA *et al*, 2016) foi utilizado com o intuito de contribuir com o entendimento sobre o estado de contaminação de linhagens celulares eucarióticas na cidade do Rio de Janeiro com esses agentes adventícios. Foi evidenciada a amplificação em 76,3% (42 de 55) das amostras analisadas, ou seja, uma incidência bastante considerável. Dados de contaminação de micoplasmas no Brasil, fornecidos por Netto e colaboradores (2009) sugeriram 56,5% e 15,2% de contaminação por micoplasma, respectivamente, em 46 amostras de soro bovino e 33 culturas de células BHK-21. Em 2014, Camargos e colaboradores, avaliando 83 linhagens celulares de Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e do Laboratório Nacional Agropecuário, também de Minas Gerais, encontraram

contaminação em 19% das amostras, também pela análise por PCR. No entanto, nenhum desses dois estudos identificou a espécie das amostras consideradas positivas. Pinheiro de Oliveira e colaboradores (2015), num estudo que envolveu a detecção de micoplasmas por PCR, além de outros contaminantes, em 88 culturas celulares, 10 amostras de tripsina e 13 de soro fetal bovino provenientes de cinco diferentes laboratórios públicos brasileiros evidenciaram que 34,1% (30 de 88) das culturas celulares estavam contaminadas com micoplasmas. Quatro amostras foram aleatoriamente sequenciadas e como resultado foi identificado o *rrs* de *M. arginini* em duas delas, *M. hyorhinis* e *A. laidlawii* nas outras duas. Rivero e colaboradores (2016) num estudo conduzido em Cuba revelaram que 19 das 50 amostras de células estavam contaminadas. Seus resultados foram confirmados por dois métodos: PCR e cultivo dos microrganismos. Ainda nesse estudo, foi observado que 75,8% das culturas de células contaminadas apresentaram pelo menos duas espécies de micoplasma e que 15,78% das amostras continham três espécies de acordo com os resultados dos testes bioquímicos. As espécies mais prevalentes foram *M. fermentans*, *A. laidlawii*, *M. orale*, *M. hyorhinis*, e *M. salivarium*.

A Ph Eur determina que a demonstração da especificidade deve ser realizada com uma adequada variedade de espécies bacterianas e que os gêneros mais relacionados aos micoplasmas (*Clostridium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*) são os mais apropriados para esta avaliação (MYCOPLASMAS..., 2014). O protocolo adotado para detecção de micoplasmas por PCR possibilitou a amplificação de todos os micoplasmas estudados, no entanto algumas bactérias não pertencentes à Classe Mollicutes também foram amplificadas. Discretos produtos de PCR foram observados a partir dos DNA de *B. vulgatus*, *C. sporogenes*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e uma forte amplificação de *Clostridium perfringens*. Nesse sentido, mais da metade das 13 bactérias testadas apresentou amplificação com os oligonucleotídeos descritos primeiramente por Wirth e colaboradores (1994) e sugeridos para o controle de micoplasmas em culturas celulares (UPHOFF; DREXLER, 2014). A avaliação da especificidade de *C. sporogenes*, *B. subtilis*; *E. coli*; *P. aeruginosa* e *S. aureus* para esse ensaio de detecção de micoplasmas por PCR já havia sido realizada em condições semelhantes por Lawson-Ferreira e colaboradores (2016) utilizado 200 UFC/ mL para extração de DNA em vez de 3ng por reação de PCR utilizados no presente estudo. Sendo assim, podemos inferir que

o protocolo adotado amplifica produtos destas bactérias, porém para que os produtos sejam revelados é necessária uma quantidade muito grande de DNA molde. Mesmo que tenha sido evidenciada a amplificação positiva de algumas bactérias não pertencentes à Classe dos Mollicutes, é factível considerar que uma eventual contaminação de linhagens celulares por qualquer uma dessas bactérias seria facilmente identificada pela turvação do meio numa inspeção visual e que os ensaios de esterilidade comumente empregados na rotina dos cultivos celulares já descartariam a possibilidade de contaminação por essas bactérias (NIMS; PRICE, 2017).

Destaque deve ser dado aos resultados das 19 amostras que tiveram seus produtos de PCR sequenciados, uma vez que as espécies contaminantes foram claramente relacionadas às instituições de ensino e pesquisa provedoras das células. *M. arginini* foi identificado em 13 diferentes amostras provenientes das instituições A e B que colaboram entre si. *M. hyorhinae*, nas 5 amostras da instituição C. Esses dados sugerem uma mesma fonte de contaminação, seja pela utilização de insumos contaminados ou mesmo contaminação cruzada entre as culturas. Já identificação de *M. orale* na instituição D, aponta para a contaminação de origem humana. Outras metodologias devem ser empregadas com objetivo de caracterizar e discriminar as espécies identificadas como contaminantes de culturas celulares nesse estudo, trazendo evidências mais concretas sobre sua fonte de contaminação. Grande número de sistemas de tipificação bacteriana está disponível, variando em relação ao esforço requerido, custo, confiabilidade e capacidade de discriminação – sendo que nenhuma técnica parece ser ideal para todas as formas de investigação. Uma das técnicas mais empregadas ao longo do tempo é o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), porém seus resultados dificilmente são comparáveis entre diferentes laboratórios (FOXMAN *et al.*, 2005). Métodos baseados no sequenciamento do genoma completo ainda são caros para grande parte dos laboratórios de pesquisa, principalmente em países em desenvolvimento. Protocolos baseados em *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) que são relativamente acessíveis e bastante reprodutíveis, estão disponíveis para *M. agalactiae*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinae*, *M. iowae*, *M. pneumoniae* e *M. synoviae* (PUBLIC DATABASES FOR MOLECULAR TYPING AND MICROBIAL GENOME DIVERSITY, 2019) e podem ser avaliados em outras espécies de micoplasmas.

A taxonomia é a disciplina científica que envolve a caracterização, classificação e nomenclatura de entidades biológicas e é fundamental também para a comunicação precisa entre cientistas e para a transferência bem-sucedida de conhecimento para o público em geral, com implicações para as políticas ambientais, legais e de pesquisa (MORA *et al*, 2011). No presente trabalho, dos 20 produtos amplificados pelo ensaio de PCR destinado ao sequenciamento nucleotídico, 19 tiveram suas sequências elucidadas e as espécies contaminantes corretamente identificadas, as quais foram depositadas na plataforma Genbank do NCBI. A amostra 25 que não foi corretamente sequenciada apresentou picos sobrepostos nos cromatogramas, possivelmente pela coamplificação de mais de uma sequência. Como outras amostras da linhagem THP-1, mesma linhagem da amostra 25, foram amplificadas por esse ensaio e tiveram o produto de PCR do micoplasma contaminante corretamente sequenciado – acredita-se que a sobreposição dos picos nos cromatogramas tenham sido causados por mais de uma espécie contaminante nesta amostra. Yarza e colaboradores (2014) sugeriram limites taxonômicos racionais para bactérias e archaea com base na identidade do *rrs* e concluíram que sequências de pelo menos 1.300 nucleotídeos são necessárias para uma hierarquia confiável de alta taxa, ou seja, de gênero e taxa superiores. O método de PCR e sequenciamento padronizado para identificação de espécie de micoplasma forneceu sequências do *rrs* que variaram entre 1.447 e 1.468 pb. No entanto, o limite de detecção desse ensaio não foi tão bom quanto o PCR de detecção, ou seja, os oligonucleotídeos utilizados para amplificar o produto de sequenciamento só foram capazes de gerar produtos apreciáveis com maiores concentrações de DNA molde (dados não mostrados). Essa diferença nos limites de detecção corrobora a menor quantidade de amplificações positivas do PCR para sequenciamento em relação ao de detecção nas amostras de células eucarióticas analisadas. Entretanto, assevera-se que o ensaio de sequenciamento de fragmento do *rrs* de micoplasmas foi desenvolvido com o intuito de identificar a espécie da Classe Mollicutes isolada em cultura pura; fim ao qual o ensaio se prestou com bastante sucesso.

Como perspectiva deste trabalho, novos oligonucleotídeos iniciadores para detecção de micoplasma serão pesquisados e avaliados em abordagem de PCR em tempo real, que apresenta diversas vantagens em relação a abordagem convencional, *end-point*. Como a viabilidade não é considerada em ensaios

moleculares de amplificação de DNA, ao contrário dos métodos de cultura que fornecem informação sobre a presença de microrganismos capazes de replicar e permanecer contaminando as linhagens celulares, o isolamento de micoplasmas oriundos de contaminação celular proporcionaria o acréscimo de linhagens à CBRVS e expandiria a possibilidade de tipificação. Os próximos passos de nossa contribuição ao entendimento do estado de contaminação de culturas celulares será dado tanto pela cultura quanto por métodos moleculares.

Devido à completa carência de qualquer MR microbiológico para micoplasmas em nosso País e ao nosso entendimento da sua importância na garantia da qualidade e confiabilidade dos ensaios realizados nos laboratórios de análise de produtos biológicos, foram avaliados métodos microbiológicos alternativos e rápidos, baseados em citometria de fluxo, para aferir a viabilidade de micoplasmas relacionados à contaminação de linhagens celulares com vistas à produção de MR.

Os estudos pioneiros de citometria de fluxo com células de micoplasmas foram conduzidos no final dos anos 80, com intuito de detectar e diferenciar os patógenos aviários *M. gallisepticum* e *M. synoviae* (MAY; BRANTON; CUCHENS, 1988). Essa metodologia também foi bastante aplicada por Assunção e colaboradores (2007) com objetivo de quantificar micoplasmas em estudos sobre o crescimento desses microrganismos utilizando a marcação com SYBR Green I, que se liga especificamente aos ácidos nucleicos e apresenta alta afinidade por DNA, porém não é capaz de discriminar células vivas de células mortas.

A cepa de *M. gallisepticum* CBRVS 00734 foi escolhida como modelo, entre os microrganismos da Classe Mollicutes incorporados na CBRVS para os experimentos de citometria de fluxo de viabilidade deste trabalho, por ser bastante representativa entre os micoplasmas recomendados para o controle de qualidade de produtos biológicos, ou seja, por pertencer ao Gênero *Mycoplasma*, fermentar glicose e apresentar crescimento ótimo a 37°C numa tensão de 5% de CO<sub>2</sub>. Além disso, essa cepa apresenta crescimento relativamente rápido e forma colônias em formato de "ovos-fritos" bem características, facilitando sua quantificação em meios de cultura sólidos.

Antes de iniciar os experimentos para aferir a viabilidade dos micoplasmas por citometria de fluxo, fez-se necessário obter informações sobre a taxa de crescimento da espécie escolhida como modelo no meio alternativo empregado ao seu cultivo. Os resultados foram bastante semelhantes aos achados de Morowitz e

Maniloff (1966) no que diz respeito ao tempo de geração da cepa modelo (*M. gallisepticum* CBRVS 00734 - PG31) cultivada no meio de Frey modificado e da cepa de *M. gallisepticum* A5969, ou seja, 3,2 e 3,5 horas, respectivamente.

A expectativa inicial para inferir a viabilidade de micoplasmas contaminantes de culturas celulares por citometria de fluxo era padronizar três diferentes marcadores de viabilidade, sendo dois específicos para células vivas (CFDA e CTC) e um para células mortas (TOPRO), de forma que os resultados de cada marcador pudessem ser corroborados pelos outros dois numa análise única.

TOPRO é um marcador de DNA, vermelho fluorescente com pico de emissão em 661 nm que apresenta como características fundamentais: ser sensível ao DNA dupla-fita e impermeável à membrana celular íntegra, sendo um indicador muito útil para aferição da baixa viabilidade em populações celulares (MILANOVICH *et al.*, 1996). CFDA, por sua vez, é um substrato fluorogênico esterificado que é hidrolisado nos grupamentos diacetato por esterases intracelulares. Mede tanto a atividade enzimática que é necessária para ativar sua fluorescência, quanto a integridade da membrana celular, imprescindível para a retenção intracelular de seu produto fluorescente verde – a carboxifluoresceína, que possui pico de emissão em 520 nm (CAVAREC *et al.*, 1990). Ambos, TOPRO e CFDA, mostraram-se eficientes em marcar positivamente as células dos micoplasmas estudados.

O CTC é um corante oxi-redutor utilizado para determinar a atividade respiratória de bactérias. Sua redução ao composto insolúvel formazan, emissor de fluorescência laranja na faixa de 630 nm, distingue células ativas, ou seja, realizando respiração celular, de células inativas (KAPRELYANTS *et al.*, 1993). Entretanto, o CTC não foi capaz de marcar de *M. gallisepticum* de forma efetiva e foi, portanto, descartado como possível indicador de viabilidade celular para os outros micoplasmas. Esse fato pode ser devido ao truncado sistema de respiração dos molicutes, uma vez que esses microrganismos carecem de quinonas e citocromos, apresentando um ciclo do ácido cítrico incompleto (RAZIN; HAYFLICK 2010). É possível que as vias metabólicas da respiração celular dos micoplasmas, por serem de baixo rendimento energético, não sejam suficientes para reduzir o CTC ao formazan fluorescente.

A importância do correto estabelecimento do controle de morte para ensaios de citometria de fluxo de viabilidade reside na necessidade da comparação das amostras aos controles em cada experimento, evitando resultados falsos. A

avaliação dos diferentes controles de morte testados experimentalmente para *M. gallisepticum* apontaram para incubação em etanol 15% como sendo o melhor tratamento, não só pela efetiva redução da viabilidade (corroborada pela contagem de colônias), mas também pela menor redução da celularidade. No entanto, os resultados dessa espécie nos ensaios em que foi utilizada como controle para os outros micoplasmas evidenciaram uma redução de aproximadamente 80% na quantidade de eventos por microlitro quando a condição experimental foi comparada ao controle de morte. Dessa forma, novas avaliações, acerca do controle de morte, podem ser realizadas com a perspectiva de reduzir essa diferença.

O citômetro de fluxo utilizado neste trabalho, o CytoFLEX, permite a enumeração de eventos por microlitro dispensando a utilização de *beads* de contagem. Tal propriedade pode ser explorada com intuito de quantificar células de micoplasmas vivas e mortas na produção de material de referência microbiológico. Gweon e colaboradores, em 2017, utilizaram os valores percentuais de citometria de fluxo de viabilidade aliados aos resultados obtidos em contadores de partículas para determinar a potência de vacinas BCG. Nesse sentido, abordagens semelhantes podem ser realizadas utilizando a quantificação de eventos e a taxa de viabilidade para inferir o número absoluto de microrganismos vivos e mortos nas amostras. O que pode ser interessante não só para métodos microbiológicos convencionas, mas também para os moleculares. Um mesmo material de referência, avaliado dessa forma, serviria a diferentes métodos de análise – onde os vivos seriam considerados como unidades formadoras de colônias e a soma de todos os eventos, cópias de genoma.

Para avaliar a aplicabilidade do ensaio citofluorimétrico padronizado para *M. gallisepticum*, em outras espécies recomendados pelas farmacopeias americana e europeia para o controle de produtos biológicos, foram selecionadas cinco novas espécies consideradas representativas. A estratégia foi incluir pelo menos uma espécie de cada um dos gêneros, ou seja, foram avaliadas *Acholeplasma laidlawii* e *Spiroplasma citri*. Dentro do gênero *Mycoplasma*, incluímos espécies provenientes de diferentes fontes de contaminação e com características metabólicas distintas. Sendo *M. gallisepticum* um contaminante aviário e fermentador de glicose, foram escolhidos: *M. arginini* e *M. hyorhinis* como contaminantes de suínos, sendo que o primeiro hidrolisa arginina e o segundo fermenta glicose. Por fim, *M. orale* proveniente de seres humanos, anaeróbio que hidrolisa arginina.

O ensaio de citometria utilizando CFDA e TOPRO padronizado para *M. gallisepticum* se mostrou eficaz também na aferição da viabilidade *M. hyorhinis* e *S. citri*. Novos estudos são necessários para melhorar a discriminação entre células vivas e mortas de *M. arginini* e *M. orale*.

Para *A. laidlawii*, a marcação com CFDA também se mostrou eficaz. No entanto os resultados com TOPRO foram inconsistentes. Notadamente, a porcentagem de células marcadas positivamente na condição experimental foi maior do que no controle de morte em todos os experimentos marcados com TOPRO. Esses resultados podem ter sido encontrados devido à natureza da membrana dessa espécie. A maioria dos mollicutes depende de colesterol para constituição da membrana, sendo parcial ou totalmente incapaz de sintetizar ácidos graxos. *A. laidlawii*, ao contrário, não apresenta colesterol na membrana e sintetiza pequenas quantidades de ácidos graxos saturados quando cultivado em meio livre de lipídeos. A composição das membranas celulares, nesse gênero, difere dos demais mollicutes sendo composta principalmente por lipídeos neutros e pigmentos (SEREBRYAKOVA *et al.*, 2011; VANYUSHKINA *et al.*, 2014). De qualquer forma, novos estudos e padronizações particulares podem ser necessários, principalmente pela comparação dos resultados de citometria com o cultivo do microrganismo, iniciando pela curva de crescimento conforme realizado com *M. gallisepticum*.

Alterações morfológicas nos gráficos FSC vs. SSC foram detectadas para todas as espécies da Classe Mollicutes marcadas com CFDA, até mesmo na menor concentração avaliada (8nM). As células apresentaram uma diminuição no FSC, porém essa população foi negativa para marcação com CFDA. Como tentativa de remover esse artefato, lavagens com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) em diferentes concentrações foram realizadas, sem sucesso (dados não mostrados). O emprego de menores concentrações de CFDA até diminuiu essas alterações morfológicas, mas também diminuiu a incorporação do marcador pelas células viáveis. Portanto, foi adotada a estratégia de exclusão de *doublets* pela clusterização de *singlets* na diagonal (FSC–A vs. FSC–H) após a definição dos *gates* por tamanho utilizando as *beads* Megamix. Após exclusão dos *doublets*, houve uma drástica diminuição desses artefatos de reduzido tamanho no *gate* morfológico SSC–H vs. FSC–H.

Outros estudos utilizando CFDA para avaliação da viabilidade de microrganismos relacionados à Classe Mollicutes não relataram a observação de

artefatos com esse marcador (GHANDI; SHAH, 2015), nem mesmo utilizando o reagente do mesmo fabricante (KOLEK *et al.*, 2016). Mohammadpour e colaboradores (2010) desenvolveram um protocolo de marcação para quantificação de *Mycoplasma agassizii* viáveis empregando não somente CFDA, mas também lavagens com PBS e também não fizeram qualquer alusão a eventos com baixo FSC. Uma possível explicação para esses artefatos, em detrimento ao observado por outros autores, pode ser a maior resolução do citômetro de fluxo utilizado, uma vez que o Cytotflex é capaz de detectar partículas menores do que 200 nm.

É notório que a citometria de fluxo ampliou largamente o conceito de viabilidade em microrganismos, adicionando diferentes estágios de viabilidade e vitalidade celular. Em 2011, Davey considerou que há seis níveis de vitalidade: i) vivo, em que a célula é metabolicamente ativa, ii) célula viva com atividade metabólica reduzida, iii) célula intacta com conteúdo reduzido de RNA, iv) célula intacta sem atividade metabólica detectável, v) célula com extenso dano membranar e vi) célula com DNA degradado. Essa classificação leva a uma pergunta inevitável: um microrganismo metabolicamente ativo, mas incapaz de se replicar pode ser considerado viável? A resposta pode variar muito dependendo do(s) marcador(es) utilizado(s) e do microrganismo estudado. Nesse sentido, é importante destacar que outros marcadores de viabilidade podem e devem ser avaliados para ensaios de citometria de fluxo de viabilidade para micoplasmas.

Em resumo, a técnica de citometria de fluxo para estudos de viabilidade se revela como uma vigorosa ferramenta para facilitar e aumentar as propriedades metroológicas na produção de material de referência de micoplasmas contaminantes de culturas de células, possibilitando o aumento da comparabilidade entre métodos de detecção destes agentes adventícios e, conseqüentemente, melhorando a segurança dos produtos biológicos.

## 6 CONCLUSÕES

Dezoito cepas de microrganismos de referência da Classe Mollicutes foram incorporadas na CBRVS, as quais estão disponíveis para utilização no desenvolvimento de diferentes ensaios de controle de qualidade de produtos biológicos no INCQS.

Todas as 18 cepas de microrganismos de referência da Classe Mollicutes incorporadas na CBRVS foram cultivadas num único meio de cultura, facilitando e tornando mais simples e acessível o cultivo de micoplasmas e sua detecção por cultivo do microrganismo.

O ensaio de detecção de micoplasmas por PCR *end-point*, padronizado previamente em Bio-manguinhos para produtos intermediários da vacina de FA, foi utilizado para avaliar o estado de contaminação de amostras de linhagens em diferentes institutos de pesquisa e ensino na cidade do Rio de Janeiro e sugeriu que 76,3% das amostras testadas estavam contaminadas, realçando a importância e o impacto dos micoplasmas como contaminantes de células eucarióticas.

O ensaio de amplificação e sequenciamento nucleotídico de fragmento do *rrs* de microrganismos da Classe Mollicutes foi eficiente no controle de qualidade dos micoplasmas incorporados na CBRVS e também para a identificação de alguns dos contaminantes amplificados a partir das linhagens celulares testadas.

Os micoplasmas contaminantes de culturas de células mais prevalentes dentre os identificados no estudo foram *M. arginini*, *M. hyorhinis* e *M. orale* em 13, 5 e 1 amostras, respectivamente.

Foi padronizado um ensaio de viabilidade baseado em citometria de fluxo para *M. gallisepticum*, o qual foi aplicado com sucesso em *M. hyorhinis*, *S. citri* e parcialmente em *A. laidlawii* (apenas CFDA).

A aplicação das metodologias de detecção e identificação de micoplasmas pode ser utilizada para o controle de culturas celulares diretamente no INCQS, notadamente no Setor de Culturas de Células do Laboratório de Vacinas Virais, Biofármacos e Culturas de Células que mantém e fornece linhagens celulares para os ensaios de controle e experimentais realizados nos Departamentos de Imunologia, Farmacologia e Toxicologia e no Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos.

A geração de conhecimento na área de quantificação e viabilidade de microrganismos por citometria de fluxo pode ser diretamente revertida para projetos de desenvolvimento tecnológico nas áreas de produção de material de referência microbiológico e controle de produtos dependentes do crescimento microbiano.

## REFERÊNCIAS

ALTERNATIVE methods for control of microbiological quality. *In*: EUROPEAN Pharmacopoeia. 8. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2014. Supplement 8.0. Chap. 5.1.6. p. 560-570.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **Titered Mycoplasma Reference Strains Panel**. Disponível em:  
<https://www.atcc.org/products/all/MP-7.aspx>. Acesso em: 12 jan. 2018.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC Medium**: 243 HI Plus Medium w/ YE #3. Disponível em:  
<https://www.atcc.org/~media/98B9A2419DDE432EBF35ED01CD98A88E.ashx>.  
 Acesso em: 10 jun. 2019a.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC medium**: 484 PPLO broth with additives for Mycoplasma. Disponível em:  
<https://www.atcc.org/~media/CAB81728C297440EA68696D66DA163C5.ashx>.  
 Acesso em: 10 jun. 2019b.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC medium**: 988 Spiroplasma medium SP-4. Disponível em:  
<https://www.atcc.org/~media/D078A95CAFED4ADE877F47632F4E2EB5.ashx>.  
 Acesso em: 10 jun. 2019 c.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC Medium**: 2611 Spiroplasma Medium – Special Modified Formulation. Disponível em:  
<https://www.atcc.org/~media/21B3644FB752489EA4CB9E2B07AA40AC.ashx>.  
 Acesso em: 10 jun. 2019d.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC Medium**: 2764 SP4-Z MEDIUM. Disponível em:  
<https://www.atcc.org/~media/CA00CE5F0D4D4FCC9BF3801F0E9A42F1.ashx>.  
 Acesso em: 10 jun. 2019e.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC medium**: 668 SMC medium. Disponível em:  
<https://www.atcc.org/~media/6ACA1A2B1C7A47EFA575372A421E1E77.ashx>.  
 Acesso em: 10 jun. 2019f.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. **ATCC medium**: 798 Plant mycoplasma medium. Disponível em:  
<https://www.atcc.org/~media/633F2A3DCD7B43BC993EBFFD80CA8516.ashx>.  
 Acesso em: 10 jun. 2019 g.

ASSUNÇÃO, P. *et al.* Applications of flow cytometry to mycoplasma. **Frontiers in Bioscience**, v.1, n.12, p. 664-672, 2007.

CAMARGOS, M. F. *et al.* Aplicação da reação em cadeia da polimerase para detecção de *Mycoplasma* spp na rotina de cultivos celulares. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p. 786-790, 2008.

CAVAREC, L. *et al.* An improved double fluorescence flow cytometry method for the quantification of killer cell/target cell conjugate formation. **Journal Immunological Methods**, v. 130, n. 2, p. 251-261, 1990

COSTA, E. A. Fundamentos da vigilância sanitária. *In*: Costa, E. A. (org.). **Vigilância sanitária temas para debate**. Salvador: EUFBA, 2009. p. 11-36.

DABRAZHNETSKAYA, A. *et al.* Preparation of reference strains for validation and comparison of mycoplasma testing methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 904–914, 2011.

DABRAZHNETSKAYA, A. *et al.* Preparation of reference stocks suitable for evaluation of alternative NAT-based mycoplasma detection methods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 100-108, 2013a.

DABRAZHNETSKAYA, A. *et al.* Collaborative study report: Evaluation of the ATCC experimental mycoplasma reference strains panel prepared for comparison of NAT-based and conventional mycoplasma detection methods. **Biologicals**, v. 41, p. 377-383, 2013b.

DALZON, B. *et al.* Culture medium associated changes in the core proteome of macrophages and in their responses to copper oxide nanoparticles. **Proteomics**; v.16, n. 22, p. 2864-2877, 2016.

DAVEY, H. M. Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 16, p. 5571-5576, 2011.

DELLEPIANE, N.; GRIFFITHS, E.; MILSTIEN J. B. New Challenges in Assuring Vaccine Quality. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, n. 2, p. 155-162, 2000.

DEUTSCHMANN, S. M. KAVERMANN, H.; KNACK, Y. Validation of a NAT-based *Mycoplasma* assay according European Pharmacopoeia. **Biologicals**, v. 38, p. 238-48, 2010.

DREIER, J.; STORMER, M.; KLEESIEK, K. Real-Time Polymerase Chain Reaction in Transfusion Medicine: Applications for Detection of Bacterial Contamination in Blood Products **Transfusion Medicine Reviews**, v. 21, n. 3, p. 237-254, 2007.

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

ELDERING, J. A. *et al.* Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell culture used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. **Biologicals**, v. 32, p. 183-193, 2004.

EMERSON J. B. *et al.* Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 86-99, 2017.

ENSAIOS microbiológicos para produtos estéreis. *In*: FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2010. v. 1. p.253-261.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Points to consider in characterization of cell lines to produce biologicals**. Maryland: FDA, 1993. 40 p.

FOOKES *et al.* Mycoplasma genitalium: whole genome sequence analysis, recombination and population structure. **BMC Genomics**, 2017.  
DOI: 10.1186/s12864-017-4399-6.

FOXMAN, B. *et al.* Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, v.2, n.10, 2005.

FREY, M. L. *et al.* A medium for the isolation of avian mycoplasmas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 29, n. 11, p. 2163-2171, 1968.

GANDHI, A.; SHAH, N. P. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum as observed by flow cytometry. **Food Microbiology**, v. 49, p. 197-202, 2015.

GENOME. **Mollicutes**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>. Acesso em: 18 jan. 2019.

GIBSON, D. G. *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. **Science**, v. 329, n. 5987, p. 52-56, 2010.

GOTO, K. *et al.* Rapid Identification of Mycoplasma pulmonis Isolated from Laboratory Mice and Rats Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 8, p. 1083-1086, 2012.

GWEON, E. *et al.* Development of a New Approach to Determine the Potency of Bacille Calmette–Guérin Vaccines Using Flow Cytometry. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 8, n. 6, p. 389-396, 2017

IEHATA, S.; VALENZUELA, F.; RIQUELME, C. Analysis of bacterial community and bacterial nutritional enzyme activity associated with the digestive tract of wild Chilean octopus (Octopus mimus Gould, 1852). **Aquaculture Research**, v. 46, p. 861–873, 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO Guide 30**: reference materials - selected terms and definitions. London, 2015. 8 p.

- JEAN, A. *et al.* Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes. **PLoS One**, v. 12, n. 2, e0172358, 2017.
- KAPRELYANTS, A. S.; KELL, D. B. The use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride and flow cytometry for the visualisation of respiratory activity in individual cells of *Micrococcus luteus*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 17, p. 115-122, 1993.
- KAZEMIHA, V. M. *et al.* Sensitivity of biochemical test in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in the National Cell Bank of Iran. **Cytotechnology**, v. 63, p. 609-620, 2014.
- KESIK-BRODACKA, M. Progress in biopharmaceutical development. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 306-322, 2018.
- KHALDA, A. K. *et al.* Isolation and Molecular Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in Chickens in Sudan. **Journal of Veterinary Medicine**, 2013. DOI: 10.1155/2013/208026.
- KOLEK, J. *et al.* Evaluation of viability, metabolic activity and spore quantity in clostridial cultures during ABE fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 6, 2016. DOI: 10.1093/femsle/fnw031
- KOONIN, E. V. How many genes can make a cell: the minimal-gene-set concept. **Annual Reviews of Genomics and Human Genetics**, v. 1, p. 99-116, 2000.
- KONG, F. *et al.* Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 3195-3200, 2001.
- KUPPEVELD, F. J. M. *et al.* Detection of *Mycoplasma* Contamination in Cell Cultures by a *Mycoplasma* Group-Specific PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 149-151, 1994.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In*: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (org.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley, 1991. p. 115-176.
- LANGDON, S. Cell culture contamination: an overview. *In*: LANGDON, S. (org.). **Cancer cell culture: Methods and Protocols**. Totowa: Humana Press, 2004. p. 309-317.
- LARTIGUE, C. *et al.* Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 632-638, 2007.
- LAWSON-FERREIRA, R. *et al.* Validation of PCR method for mycoplasma detection in the Yellow Fever-vaccine quality control. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 1-13, 2016.

LINSINGER, T. P. J. *et al.* Homogeneity and stability of reference materials. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 6, p. 20–25, 2001.

LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. **Candidatus**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/-candidatus.html>. Acesso em: 26 jan. 2019.

LOZE, P. M. *et al.* Vaccines are different: A systematic review of budget impact analyses of vaccines. **Vaccine**, 2017. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.03.088.

MANILOFF, J. **Phylogeny of mycoplasmas**. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (org.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 549-559.

MATSUOKA, H. *et al.* Flow Cytometric Method for in situ Preparation of Standard Materials of a Small Defined Number of Microbial Cells with Colony-Forming Potentiality. **Journal of AOAC International**, v. 97, n. 2, p. 479-483, 2014.

MAY, J. D.; BRANTON, S. L.; CUCHENS, M. A. Identification of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by flow cytometry. **Avian Disease**, v. 32, p. 3, p. 513-516, 1988.

MILANOVICH, N. *et al.* Binding of TO-PRO-3 and TOTO-3 to DNA: Fluorescence and Hole-Burning Studies. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 100, p. 9181-9186, 1996.

MILNE, C.; DAAS, A. Establishment of European pharmacopoeia *Mycoplasma* reference strains. **Pharmeuropa Bio**, v. 1, p. 57-72, 2006.

MOHAMMADPOUR, H. A. *et al.* Flow cytometric method for quantifying viable *Mycoplasma agassizii*, an agent of upper respiratory tract disease in the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 347-51, 2010.

MORA, C. *et al.* How many species are there on Earth and in the ocean? **PLoS Biology**, 2011. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001127.

MOROWITZ, H. J.; MANILOFF J. Analysis of the life cycle of *Mycoplasma gallisepticum*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 4, p. 1638-1644, 1966.

MYCOPLASMA testing for cell substrates used for the production of biotechnological/biological products. In: JAPANESE Pharmacopoeia. 14. ed. Tokyo: Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2001. Chap. 9. p. 1316-1319.

MYCOPLASMA tests. In: THE UNITED States Pharmacopoeia. 39. ed. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2016. v. 1. Chap. 63. p. 130-136.

MYCOPLASMAS. In: EUROPEAN Pharmacopoeia. 8. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2014. Supplement 8.0. Chap. 2.6.7. p. 178-183.

NASCIMENTO, E.R. Micoplasmoses. *In*: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. (org.), **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. p. 281–304.

NEJAT, N.; VADAMALAI, G.; DICKINSON, M. 2011. *Spiroplasma citri*: a wide host range phytopathogen. **Plant Pathology Journal**, v. 10, p. 46-56, 2011.

NETTO, C. *et al.* Quality Control of Biotechnological Inputs Detecting Mycoplasma. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 239-243, 2015.

NEULINGER, S. C. *et al.* Tissue-associated "Candidatus Mycoplasma corallicola" and filamentous bacteria on the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 5, p.1437-1444, 2009.

NIKFARJAM, L.; FARZANEH, P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. **Cell Journal**, v. 13, n. 4, p. 203-212, 2012.

NIMS, R. W.; PRICE, P. J. Best practices for detecting and mitigating the risk of cell culture contaminants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, 2017. DOI: 10.1007/s11626-017-0203-9

NUBLING, C. M. *et al.* Mycoplasma Collaborative Study Group. World Health Organization International Standard To Harmonize Assays for Detection of Mycoplasma DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 17, p. 5694-702, 2015.

NUCLEOTIDE. **Mollicutes**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>. Acesso em: 18 jan. 2019.

OLARERIN-GEORGE, A. O.; HOGENESCH, J. B. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. **Nucleic Acids**, v. 43, n. 5, p. 2535-2542, 2015.

PALUMBI, S. R. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *In*: HILLIS D.; MORITZ, C.; MABLE, B. (org.). **Molecular Systematics**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. p. 205-247.

PARENTERAL DRUG ASSOCIATION. **Technical Report 33**: Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods. Maryland: PDA, 2000. 45 p.

PETTERSSON, B., UHLEN, M.; JOHANSSON K.-E. Phylogeny of Some Mycoplasmas from Ruminants Based on 16s rRNA Sequences and Definition of a New Cluster within the Hominis Group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 4, p. 1093-1098, 1996.

PINHEIRO DE OLIVEIRA, T. F. *et al.* Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. **Biologicals**, v. 41:407-414, 2013.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. Métodos alternativos para enumeração e identificação de microrganismos. *In*: PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. (org.). **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2015. p 129-151.

PUBLIC DATABASES FOR MOLECULAR TYPING AND MICROBIAL GENOME DIVERSITY. **Databases**. Disponível em: <https://pubmlst.org/databases>. Acesso em: 22 fev. 2019.

RAYMOND, Y.; CHAMPAGNE, C. P. The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. **Food Microbiology**, v. 46, p. 176-183, 2014.

RAZIN, S. Time-line of significant contributions to mycoplasmaology. **Biologicals**, v. 38, p. 191-192, 2010.

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

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. *et al.* Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094-156, 1998.

RIVERO, E. L. *et al.* Prevalence of Mollicutes in Cell Cultures: experience in Cuba. **Revista de Salud Animal**, v. 38, n. 2, p. 100-104, 2016.

ROSAS, C. O. *et al.* Development of reference materials for proficiency tests in food microbiology. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 15-22, 2010.

ROTTEM, S.; BARILE, M. F. Beware of mycoplasmas. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 143-151, 1993.

SALLING, H. K.; BANG-CHRISTENSEN, S. R. Multi-primer qPCR assay capable of highly efficient and specific detection of the vast majority of all known Mycoplasma **Biologicals**, v. 44, n. 3, p. 129-138, 2016.

SEREBRYAKOVA, M. V. *et al.* The acylation state of surface lipoproteins of mollicute *Acholeplasma laidlawii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 26, p. 22769-22776, 2011.

STAKENBORG, T. **Identification of mollicutes and characterisation of Mycoplasma hyopneumoniae isolates**. 2005. 200 f. Tese (Doutorado em Veterinary Science) – Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Bruxelas, 2005.

SUAREZ-PEREZ, A. *et al.* *Mycoplasma neophronis* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract of Canarian Egyptian vultures (*Neophron percnopterus majorensis*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1321-1325, 2012.

SUNG, H. *et al.* PCR-Based Detection of Mycoplasma Species. **The Journal of Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 42-49, 2006.

SCHWARZ, D. *et al.* Comparative genomic analysis of mollicutes with and without a chaperonin system. **PLoS ONE**, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0192619.

TEYSSOU, R. *et al.* Detection of Mollicute Contamination in Cell Cultures by 16S rDNA Amplification. **Molecular and Cellular Probes**, v. 7, n. 3, p. 209-216, 1993.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Comparative PCR Analysis for Detection of Mycoplasma Infections in Continuous Cell Lines. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 38, n. 2, p. 79-85, 2002.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures in Current Protocols in Molecular Biology. **Current Protocols in Molecular Biology**, sup. 106, p. 28.4.1-28.4.14. DOI: 10.1002/0471142727.mb2804s106.

VACINAS para uso humano. *In*: FARMACOPEIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2010. v. 2. p.1353-1372.

VALIDATION of Alternative Microbiological Methods. *In*: THE UNITED States Pharmacopeia. 39. ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2016. v. 1. Chap. 1223. p. 1616-1630.

VANYUSHKINA, A. A. *et al.* Metabolomic analysis of three Mollicute species. **PLoS One**, v. 9, n. 3:e89312, 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0089312.

VOLOKHOV, D. V. *et al.* Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: review of alternative non-microbiological techniques. **Molecular and Cellular Probes**, v. 25, p. 69-77, 2011.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nature Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1136-1145, 2018.

WEISBURG, W. G. *et al.* A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. **Journal of Bacteriology**, v.171, p. 6455-6467, 1989.

WIRTH, M. *et al.* Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. **Cytotechnology**, v. 16, p. 67-77, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General Requirements for the Sterility Tests of Biological Substances**. Annex 3: Requirements for Biological Substances. Geneva: WHO, 1998. 6 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vaccine quality**. Disponível em: [http://www.who.int/immunization\\_standards/vaccine\\_quality/en](http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/en). Acesso em: 23 nov. 2018.

XUE, G. *et al.* In Vitro Activities of the Benzoquinolizine Fluoroquinolone Levonadifloxacin (WCK 771) and Other Antimicrobial Agents against Mycoplasmas and Ureaplasmas in Humans, Including Isolates with Defined Resistance Mechanisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2018. DOI: 10.1128/AAC.01348-18.

YARZA, P. *et al.* Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 635-645, 2014.

YATOO, M. I. *et al.* Mycoplasmosis in small ruminants in India: A Review. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 6, n. 2, p. 264-281, 2018.

YOUNG, L. *et al.* Detection of Mycoplasma in cell cultures. **Nature Protocols**, v. 5, n. 5, p. 929-934, 2010.

TULLY, J. G. *et al.* Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 43, p. 378-385, 1993.

## **ANEXO 1 – FORMULAÇÕES DOS MEIOS DE CULTURA RECOMENDADOS PELO ATCC PARA CADA UMA DAS CEPAS DE MICRORGANISMOS DA CLASSE MOLLICUTES E MEIOS RECOMENDADOS PELAS FARMACOPEIAS AMERICANA E EUROPEIA PARA CONTROLE DE MICOPLASMAS EM PRODUTOS BIOLÓGICOS**

### **PARTE A: MEIOS DE CULTURA RECOMENDADOS PELO ATCC**

As formulações dos meios de cultura recomendados pelo American Type Culture Collection (ATCC) para o crescimento dos microrganismos da Classe Mollicutes utilizados nesse estudo estão descritos neste anexo e são formulados a partir de duas diferentes frações. A primeira fração, denominada de base, é esterilizada por calor (121°C por 15 min), enquanto a segunda, denominada de suplemento, deve ser esterilizada por filtração (0,22 µM). A mistura do suplemento à base deve ser realizada quando ambos estiverem em 55°C. O Agar é adicionado apenas na produção dos meios sólidos.

**1- Meio ATCC 243 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2019a)**Base:

Caldo de infusão de coração.....	17,5 g
Agar nobre (se necessário).....	10 g
Água (q.s.p.).....	700 mL

Suplemento:

Soro de cavalo (inativado a 56°C por 30 min).....	200 mL
Extrato de levedura 15%.....	100 mL

Ajustar o pH final para 7,4.

**2- Meio ATCC 484 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2019b)**Base:

Caldo PPLO.....	14,7 g
Arginina hidrocloreada.....	2,1 g
Agar nobre (se necessário).....	10 g
Água (q.s.p.).....	700 mL

Suplemento:

Meio MEM (100X).....	1 mL
Glutamina.....	1,46 g
Vermelho de fenol.....	20 mg
Soro de cavalo (inativado a 56°C por 30 min).....	200 mL
Extrato de levedura 15%.....	100 mL

Ajustar o pH final para 7,1.

**3- Meio ATCC 988 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2019c)**Base:

Caldo PPLO.....	11 g
Triptona.....	10 g
Glicose.....	5 g
Agar nobre (se necessário).....	10 g
Água (q.s.p.).....	625 mL

Suplemento:

CMRL (10X).....	50 mL
Yestolate (2%).....	100 mL
Vermelho de fenol.....	20 mg
Soro fetal bovino (inativado a 56°C por 30 min).....	170 mL
Extrato de levedura 15%.....	35 mL
Água (q.s.p.).....	375 mL

Ajustar o pH final para 7,5.

**4- Meio ATCC 2611 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2019d)**Base:

Caldo PPLO.....	3,5 g
Triptona.....	10 g
Peptona.....	5 g
Agar nobre (se necessário).....	15 g
Água (q.s.p.).....	500 mL

Suplemento:

CMRL (10X).....	50 mL
Yestolate (10%).....	20 mL
Glicose.....	5 g
Vermelho de fenol.....	20 mg
Soro fetal bovino (inativado a 56°C por 30 min) .....	170 mL
Extrato de levedura 15%.....	35 mL
Água (q.s.p.).....	500 mL

Ajustar o pH final para 7,4.

**5- Meio ATCC 2764 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2019e)**Base:

Caldo PPLO.....	3,5 g
Triptona.....	10 g
Peptona.....	5 g
DNA (esperma de peixe).....	0,2 g
Agar nobre (se necessário).....	10 g
Água (q.s.p.).....	640 mL

Suplemento:

CMRL (10X).....	50 mL
Yestolate (2%).....	100 mL
Glicose.....	10 g
L-cisteína hidrocloreada.....	0,01 g
Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo.....	0,1 g
Soro fetal bovino (inativado a 56°C por 30 min).....	85 mL
Soro suíno (inativado a 56°C por 30 min).....	85 mL
Água (q.s.p.).....	360 mL

Ajustar o pH final para 7,4.

**6- Meio ATCC 668 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2019f)**Base:

Caldo PPLO.....	21 g
Triptona.....	10 g
Sorbitol.....	70 g
Agar nobre (se necessário).....	10 g
Água (q.s.p.).....	650 mL

Suplemento:

Arginina hidrocloreada.....	4,2 g
Glicose.....	1 g
Frutose.....	1 g
Sacarose.....	10g
Vermelho de fenol.....	20 mg
Soro equino (inativado a 56°C por 30 min).....	200 mL
Extrato de levedura 15%.....	100 mL
Água (q.s.p.).....	350 mL

Ajustar o pH final para 7,5.

**7- Meio ATCC 798 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, 2019g)**Base:

Caldo PPLO.....	21 g
Triptona.....	10 g
Peptona.....	8 g
Sorbitol.....	70 g
D-glicose.....	1 g
D-frutose.....	1 g
Sacarose.....	10 g
Agar nobre (se necessário).....	10 g
Água (q.s.p.).....	700 mL

Suplemento:

Meio Schneider para Drosophila.....	160 mL
Vermelho de fenol.....	6 mg
Soro fetal bovino (inativado a 56°C por 30 min) .....	50 mL
Extrato de levedura 15%.....	10 mL
Água (q.s.p.).....	300 mL

Ajustar o pH final para 7,8.

**PARTE B: MEIOS DE CULTURA RECOMENDADOS PELA FARMACOPEIA EUROPEIA (MYCOPLASMAS..., 2014)**

**8- Hayflick (recomendado para detecção de micoplasmas em geral)**

Caldo de infusão de coração.....	90 mL
Soro equino.....	20 mL
Extrato de levedura 250 g/L.....	10 mL
Vermelho de fenol 0,6 g/L.....	5 mL
Penicilina 20.000 UI/mL.....	0,25 mL
DNA 2 g/L.....	1,2 mL

**9- Meio Frey (recomendado para a detecção de *M. synoviae*)**

Caldo de infusão de coração.....	90 mL
Vitaminas essenciais.....	0,025 mL
Solução de glicose monohidratada 500 g/L.....	2 mL
Soro suíno.....	20 mL
Solução de L-cisteína hidrocloreada 10 g/L.....	10 mL
Solução de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo 10 g/L.....	10 mL
Vermelho de fenol 0,6 g/L.....	5 mL
Penicilina 20.000 UI/mL.....	0,25 mL

**10- Meio Friis (recomendado para a detecção de micoplasmas não-aviários)**

Solução balanceada de Hank.....	800 mL
Água destilada.....	67 mL
Infusão de cérebro e coração.....	135 mL
Caldo PPLO.....	248 mL
Solução extrato de levedura 170 g/L.....	60 mL
Bacitracina.....	250 mg
Meticilina.....	250 mg
Vermelho de fenol 5 g/L.....	4,5 mL
Soro equino.....	165 mL
Soro suíno.....	165 mL