

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

Rafael Lawson Ferreira

Detecção de micoplasmas por Reação em Cadeia da
Polimerase (PCR) em Produtos Intermediários da Vacina
contra Febre Amarela Produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO

2007

F383 Ferreira, Rafael Lawson

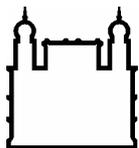
Detecção de micoplasmas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em produtos intermediários da vacina contra a febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz / Rafael Lawson Ferreira. – Rio de Janeiro, 2007. xviii, 95 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Tecnologia de Imunobiológicos, 2007.
Bibliografia: f. 75-82.

1. Micoplasma. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Controle de qualidade. 4. Vacina contra febre amarela. I. Título.

CDD: 616.91854

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Departamento de Controle de Qualidade, sob a orientação da Dr^a Elena Cristina Caride Siqueira Campos e do Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento.



Ministério da Saúde

FIUCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

Rafael Lawson Ferreira

**Detecção de micoplasmas por Reação em Cadeia da Polimerase
(PCR) em Produtos Intermediários da Vacina contra Febre Amarela
Produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz**

**ORIENTADORES: Dr^a. Elena Cristina Caride Siqueira Campos e Dr.
Elmiro Rosendo do Nascimento**

Aprovada em: 19 de junho de 2007

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Maria Helena Cosendey - Presidente
Prof. Dr. Ricardo Galler
Prof. Dr^a. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro

Dedico este trabalho aos meus pais Artur e Solange que sempre me apoiaram e me ajudaram, com seu amor e amizade, em todos os momentos de minha vida e à minha namorada Ivana pelo apoio incondicional, pelo auxílio nos momentos difíceis e principalmente pelos momentos felizes juntos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Cruz por ter proporcionado as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À Bio-Manguinhos pelo apoio financeiro e condições de trabalho.

Ao Dr. Akira Homma, maior incentivador do Curso de Mestrado Profissional.

À Coordenação do Mestrado Profissional na pessoa da Dr^a Sheila Farage pelo seu interesse em cada um dos alunos e na pessoa da secretária, Zaíra Antunes Prado, pelo seu pronto atendimento às nossas solicitações e amizade.

À querida Dr^a. Elena Cristina Caride Siqueira Campos, orientadora, colaboradora e amiga.

Ao camarada Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento, orientador e amigo.

À Darcy Akemi Hokama, gerente do Departamento de Controle de Qualidade, que sempre acreditou neste projeto.

Ao Fernando César pela importante contribuição neste trabalho.

À Dr^a Maria Helena Cosendey pela paciência e minuciosa revisão desta tese.

Aos amigos e colegas de trabalho do Setor de Testes Bioquímicos e Moleculares, Luis Cláudio, Wilma D'Elia, Ricardo Brum, Helena Pontes, Caio Hajime e Sergio Sampaio pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas do Setor de Processos e Insumos, Josiane, Paulo e principalmente Jonas Borges no auxílio das técnicas de cultivo, provisão de material e pelos proveitosos ensinamentos.

Aos amigos do Setor de Meios de Cultura, principalmente Rodrigo Gomes e Tereza pela constante boa vontade.

A todos os colegas do Laboratório de Controle Microbiológico pelo apoio de todos os dias.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Recombinante, Geraldo Armôa, Marco Alberto, João Pedro e principalmente Maria Luiza, pela ajuda incondicional.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Tecnologia Viroológica, principalmente Idevaldo, Alfredo, Márcia e Aymara.

Aos amigos do Núcleo de Biossegurança, principalmente Adriano Campos.

Aos Membros da Banca Examinadora por aceitarem participar da análise desta tese.

Aos amigos e colegas do Mestrado Profissional que juntos iniciaram este caminho de conhecimento.

A todos os Professores do Curso de Mestrado Profissional por enriquecerem meus conhecimentos.

A todos os funcionários da Fiocruz, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

ÍNDICE

1 – INTRODUÇÃO	01
1.1 – Apresentação.	01
1.2 – Micoplasmas.	02
1.2.1 – Classificação e estrutura genômica.	02
1.2.2 – Etiologia e patogenia.	07
1.2.3 – Filogenia.	12
1.2.4 – Diagnóstico clássico e molecular.	13
1.3 – Produção e controle de qualidade da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/ Fiocruz.	17
2 – OBJETIVOS	24
2.1 – Geral.	24
2.2 – Específicos.	24
3 – MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 – Apresentação.	25
3.2 – Cepas bacterianas.	25
3.3 – Produtos intermediários utilizados.	26
3.4 – Meios de cultura.	26
3.5 – Cultivo de micoplasmas e construção de lotes semente.	27
3.6 – Quantificação dos lotes semente.	28
3.7 – Obtenção de DNA para o PCR.	29
3.7.1 – Fenol/clorofórmio.	29
3.7.2 – Fervura.	30
3.7.3 – Kit comercial de Extração de DNA.	30
3.8 – Reação em cadeia da polimerase (PCR).	31
3.9 – Seqüenciamento dos produtos de PCR.	31
3.10 – Desenho do mapa de restrição e corte “in silico” com enzimas de restrição.	33
3.11 – Digestão dos produtos de PCR.	33

4 – RESULTADOS	34
4.1 – Extração de DNA pela técnica de fenol/clorofórmio e ampliação de fragmentos específicos de DNA por PCR de cepas de <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. orale</i>	34
4.2 – Estabelecimento do limite de detecção da reação em cadeia da polimerase (PCR).	35
4.3 – Extração de DNA por fervura.	36
4.4 – Determinação da especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR).	37
4.5 – Desafio da metodologia frente aos produtos intermediários da vacina de febre amarela.	38
4.6 – Elaboração do Procedimento Operacional Padronizado (POP).	40
4.7 – Amostras testadas em 2005 e 2006.	40
4.8 – Produção e quantificação de bancos de cepas de micoplasmas.	42
4.9 – Ampliação por PCR das cepas <i>M. gallisepticum</i> (ATCC 15302), <i>M. pneumoniae</i> (ATCC 15492), <i>M. synoviae</i> (Charles River 538631) e <i>M. orale</i> SEPIN Bio.	44
4.10 – Avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos utilizando baixa temperatura de anelamento.	46
4.11 – Determinação do limite de detecção da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de culturas de micoplasma quantificadas.	48
4.12 – Seqüenciamento dos produtos de PCR.	51
4.13 – Avaliação da performance de amplificação por PCR da cepa <i>M. gallisepticum</i> (ATCC 15302) com os oligonucleotídeos utilizados na reação de seqüenciamento.	54
4.14 – Desenho dos mapas de restrição dos produtos de PCR <i>in silico</i> .	55
4.15 – Digestão dos produtos de PCR.	59
4.16 – Estabelecimento do limite de detecção em unidades formadoras de colônias para as cepas <i>M. synoviae</i> (Charles River 538631) e <i>M. pneumoniae</i> (ATCC 15492) nos produtos intermediários da vacina contra febre amarela.	59

5 – DISCUSSÃO	63
6 – CONCLUSÕES	74
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8 – APÊNDICE	83
9 – ANEXO	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
%GC	Porcentagem de purinas
°C	Grau Celsius ou centígrado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção Americana de Cultura e Depósito
Bio-Manguinhos	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
pb	pares de bases
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CEF	Cultura de fibroblasto de embrião de galinha, do inglês “Chicken Embryo Fibroblasts”
CR	Laboratórios Charles River
DAPI	Corante de ácidos nucléicos (4'-6'-diamino-2-fenil-indol-fluorocromo)
DEQUA	Departamento de Controle de Qualidade
ddNTP	Dideoxiribonucleotídeos”
DNA	Ácido desoxiribonucléico, do inglês “Desoxyribonucleic Acid”
dNTP	Deoxiribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), do inglês “Deoxyribonucleotide”
DTP e Hib	Difteria, tétano, coqueluche (<i>B. pertussis</i>) e <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês “Etilendiaminotetraacetic Acid”
<i>et al.</i>	e colaboradores
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Gravidade
g	grama
h	hora
kg	quilograma

kpb	quilo pares de bases
L	litro
LACOM	Laboratório de Controle Microbiológico
M	Molar
Meio PPLO	Meio de cultura para micoplasmas desenvolvido neste estudo
mg	miligramas
min	minutos
mL	mililitro
mM	Mili Molar
mm	milímetro
n°	número
nt	nucleotídeo
ng	nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
p/v	Peso/volume
PAG	Produto acabado a granel
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate Buffer Saline”
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês “polymerase chain reaction”
pmoles	picomoles
PPLO	Antiga designação de micoplasmas, do inglês “Pleuro pneumonia like organism”
POP	Procedimento operacional padronizado
RNA	Ácido ribonucléico, do inglês “Ribonucleic Acid”
RNAse	Ribonuclease
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
rDNA	Ácido desoxiribonucléico que codifica para o ácido ribonucléico ribossomal
s	segundos
SEEST	Setor de Esterilidade
SEMEC	Setor de Meios de Cultura
SPF	Ovos livres de patógenos, do inglês “Specific Pathogen Free”

SEPIN	Setor de Processos e Insumos
SETBM	Setor de Testes Bioquímicos e Moleculares
TE	Solução Tris:EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) amino-metano
U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônias
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância, do inglês “The United Nations Children’s Fund”
v/cm ²	Volts por centímetro quadrado
v/v	Volume/volume
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês “World Health Organization”

ÍNDICE DE TABELAS

1.1 – Taxonomia e principais características da classe Mollicutes.	03
1.2 – Testes realizados pelo LACOM para assegurar a qualidade da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos.	19
3.1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de seqüenciamento.	32
4.1 – Quantificação do DNA extraído pela técnica de fenol/clorofórmio.	35
4.2 – Amostras de produtos intermediários testados entre os anos de 2005 e 2006.	41
4.3 – Quantificação dos bancos de cepas de micoplasmas.	44
5.1 – Análise dos oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO.	70

ÍNDICE FIGURAS

1.1 – Genoma completo de <i>M. pneumoniae</i> , seqüência NC_000912.	06
1.2 – Tamanho relativo de <i>M. hominis</i> e <i>Ureaplasma sp.</i> comparado a outros microrganismos.	08
1.3 – Fluxograma da produção da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/ Fiocruz.	18
1.4 – Ilustração esquemática do teste de detecção de micoplasmas pelo método direto.	21
1.5 – Fotografia de uma cultura <i>M. pneumoniae</i> em meio sólido (agar), observada por microscopia convencional (aumento de 100X).	22
1.6 – Fotografia, a partir de microscópio de fluorescência, de uma cultura de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) analisadas pelo DAPI.	23
1.7 – Fotografia, a partir de microscópio de fluorescência, de uma Cultura de fibroblastos de embrião de galinha (CEF), infectados com <i>M. gallisepticum</i> , analisadas pelo DAPI.	23
4.1 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliação da performance dos oligonucleotídeos GPO-1 e MGSO nas amostras de <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. orale</i> .	35
4.2 – Estabelecimento do limite de detecção da reação em cadeia da polimerase (PCR) para os DNA extraídos de <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. orale</i> .	36
4.3 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliação do método de extração de DNA por fervura.	37
4.4 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificação da especificidade da metodologia estabelecida utilizando DNA proveniente de cepas bacterianas não pertencentes ao gênero <i>Mollicutes</i> .	38
4.5 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando DNA extraído dos produtos intermediários da vacina de febre amarela contaminados ou não com micoplasma.	39
4.6 – Exemplo de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando DNA extraído dos produtos intermediários da vacina de febre amarela testados nos anos de 2005 e 2006.	42
4.7 – Fotografias de culturas de micoplasmas em placas de <i>Petri</i> contendo meio sólido (agar PPLO) com, aumento de 100X.	43

4.8 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando DNA extraído a partir de tubos provenientes do banco de cepas de micoplasmas.	45
4.9 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) com modificações na temperatura de anelamento.	45
4.10 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos utilizando baixa temperatura de anelamento.	47
4.11 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos.	47
4.12 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. gallisepticum</i> em caldo PPLO, utilizando uma temperatura de anelamento de 63°C.	49
4.13 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. gallisepticum</i> em caldo PPLO, utilizando uma temperatura de anelamento de 55°C.	49
4.14 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. orale</i> em caldo PPLO.	50
4.15 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. synoviae</i> em caldo PPLO.	50
4.16 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. pneumoniae</i> em caldo PPLO.	51
4.17 – Análise filogenética dos fragmentos do rDNA 16S das cepas <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. orale</i> (SEPIN Bio), <i>M. gallisepticum</i> ATCC 15302, <i>M. synoviae</i> (CR 538631) e <i>M. pneumoniae</i> (ATCC 15492) e outras seqüências de micoplasmas depositadas no GenBank.	53
4.18 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliação da performance dos oligonucleotídeos GPO-1 com MGSO, GPO-3 com MGSO e GPO-1 com RLF-1 utilizando duas temperaturas de anelamento (55 e 63°C) nas amostras de <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. pneumoniae</i> .	55
4.19 – Pontos de corte do produto de PCR de <i>M. gallisepticum</i> utilizando apenas a enzima de restrição <i>Hinfl.</i> , uma vez que esta seqüência não possui sítios para <i>Mbol</i> .	56
4.20 – Pontos de corte do produto de PCR de <i>M. synoviae</i> utilizando apenas a enzima de restrição <i>Sau3AI</i> (isoesquisômero da <i>Mbol</i>), uma vez que esta seqüência não possui sítios para <i>Hinfl.</i>	56

4.21 – Pontos de corte do produto de PCR de <i>M. pneumoniae</i> utilizando apenas a enzima de restrição <i>Sau3AI</i> (isoesquisômero da <i>Mbol</i>), uma vez que esta seqüência não possui sítios para <i>Hinfl</i> .	56
4.22 – Simulação da eletroforese da dupla digestão do produto de PCR de <i>M. gallisepticum</i> utilizando as enzimas <i>Hinfl</i> e <i>Mbol</i> .	57
4.23 – Simulação da eletroforese da dupla digestão do produto de PCR de <i>M. synoviae</i> utilizando as enzimas <i>Hinfl</i> e <i>Mbol</i> .	58
4.24 – Simulação da eletroforese da dupla digestão do produto de PCR de <i>M. pneumoniae</i> utilizando as enzimas <i>Hinfl</i> e <i>Mbol</i> .	58
4.25 – Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos com as enzimas de restrição <i>Mbol</i> e <i>Hinfl</i> .	59
4.26 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. synoviae</i> no PAG 071VFA005Z.	60
4.27 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. synoviae</i> na suspensão viral 05FCE049.	61
4.28 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. pneumoniae</i> no PAG 071VFA005Z.	61
4.29 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de <i>M. pneumoniae</i> na suspensão viral 05FCE049.	62

RESUMO:

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ (BM) é um importante centro de produção de imunobiológicos na América Latina. Dentre as vacinas produzidas em Bio-Manguinhos, sob condições de boas práticas de fabricação, a vacina contra Febre Amarela (VcFA), produzida a partir de ovos embrionados SPF, é certificada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Organização Mundial de Saúde para suprir a demanda do Ministério da Saúde e das Agências das Nações Unidas. Para garantir a segurança da vacina assim como a ausência de agentes adventícios, testes de Controle de Qualidade (CQ) devem ser realizados na matéria-prima e nas diferentes etapas da produção. Por recomendação da Organização Mundial de Saúde, em vacinas produzidas para o uso humano deve ser demonstrada a ausência de *M. orale* e *M. pneumoniae* e quando material de origem aviária é utilizado durante a produção, ausência de *M. gallisepticum* e *M. synoviae*. Da mesma forma como o desenvolvimento de novos produtos tem evoluído, o CQ deve seguir estas novas abordagens cujos benefícios imediatos seriam a rapidez na liberação de resultados, maior sensibilidade e especificidade. O micoplasma é um importante agente adventício amplamente encontrado em diferentes tipos de substratos biológicos, porém é um microrganismo fastidioso e de difícil detecção pelo exame direto (cultura do microrganismo) o qual requer um longo prazo para obtenção de resultados, cerca de 35 dias. Em nosso trabalho selecionamos o par de oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO com o objetivo de estabelecer um teste para detecção de micoplasmas por PCR no CQ da VcFA. Os oligonucleotídeos selecionados amplificam fragmentos de aproximadamente 700 pb na região do gene do rDNA 16S. Foram testadas diferentes metodologias de extração de DNA, como fervura, fenol/clorofórmio e kits comerciais avaliando a adaptabilidade da técnica para os diferentes produtos intermediários. A metodologia proposta, neste trabalho, foi capaz de detectar *M. pneumoniae* em concentrações entre 6,25 e 3,125 UFC/mL e *M. synoviae* entre 12,5 e 6,25 UFC/mL, em produtos intermediários intencionalmente contaminados, em concentrações inferiores do que as preconizadas pela OMS. Além disso, os oligonucleotídeos selecionados demonstraram especificidade pelas espécies de micoplasmas utilizadas, não apresentando amplificação quando o DNA de outras espécies bacterianas foi utilizado. Paralelamente, foi realizado um ensaio de polimorfismo do comprimento dos fragmentos da restrição (RFLP) para identificação da espécie de micoplasma, onde selecionamos as enzimas de restrição *Mbol* e *Hinfl*, capazes de diferenciar as três espécies de micoplasmas de referência utilizadas (*M. gallisepticum*, *M. pneumoniae* e *M. synoviae*).

ABSTRACT:

The Institute of Technology in Immunobiologicals - Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ is an important immunobiological production center in Latin America. Among the vaccines produced in Bio-Manguinhos under good manufacturing practice, the vaccine against Yellow Fever (YF-Vaccine), produced in SPF embrionated eggs, is certified by the Brazilian National Surveillance Agency and World Health Organization to achieve the demand of the Brazilian Ministry of Health and the United Nations Agencies. In order to guarantee the safety of the vaccine as well as the absence of contaminant agents, tests of Quality Control (QC) must be done along its production. By advice of WHO, on vaccines produced for human use, there must be demonstrated the absence of *M. orale* and *M. pneumoniae*. When poultry material is used during the production, absence of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* is also required. Mycoplasma is a fastidious microorganism of difficult detection through culturing, which requires a long term for conclusive results, about 35 days. We selected the primer pair GPO-1 and MGSO to establish a mycoplasma detection through PCR in YF-Vaccine. The selected oligonucleotides amplify fragments of roughly 700 bp in the 16S rRNA gene region. Different methodologies of DNA extraction were performed, such as boiling, phenol/chloroform and commercial kits, thus, evaluating the adaptability of each method for the intermediary products. The proposed methodology in this study was capable to detect *M. pneumoniae* in concentration between 6,25 and 3,125 CFU/mL and *M. synoviae*, between 12,5 and 6,25 CFU/mL, in spiked intermediate products which constitute lower detection limits throw those stipulated by WHO. In addition, selected oligonucleotides demonstrated specificity to the Mycoplasma species used in this work, not presenting amplification products when other bacteria species was used. Three reference mycoplasmas species (*M. gallisepticum*, *M. pneumoniae* and *M. synoviae*) could be differentiated based on restriction fragments length polymorphism (RFLP) after digestion of the amplification products by *Hin*I and *Mbo*I.

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Apresentação

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos, fundado em maio de 1976, faz parte das treze unidades pertencentes à Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz e, inicialmente, sua finalidade específica era produzir vacinas. Posteriormente, foi implementada a produção de reagentes para diagnóstico (Benchimol 2001) e, mais recentemente, a fabricação de biofármacos para o Ministério da Saúde. O Instituto Bio-Manguinhos é um dos principais centros de produção de imunobiológicos da América Latina, contribuindo efetivamente para o esforço nacional de alcançar uma posição de independência estratégica na produção de vacinas. Baseada em tal preceito, a instituição vem construindo uma imagem comprometida com o bem-estar da população e com o avanço da ciência e da tecnologia. Este compromisso tem orientado o esforço do Instituto na busca incessante do desenvolvimento de novos produtos e novas tecnologias (Bio-Manguinhos/Fiocruz 2007). O estabelecimento de Bio-Manguinhos iniciou-se em 1976, com a produção da vacina polissacarídica contra *Neisseria meningitidis* sorogrupos A e C. Toda a tecnologia de produção e controle de qualidade desta vacina foi absorvida através do acordo assinado com o Instituto Mérieux da França. Mais tarde em 1979, Bio-Manguinhos incorporou a produção das vacinas contra febre Amarela, cólera e febre Tifóide, até então realizadas pelo Instituto Oswaldo Cruz – IOC (Benchimol 2001). Atualmente Bio-Manguinhos é considerado um dos maiores fornecedores de vacinas para o Ministério da Saúde, incluindo vacinas pediátricas como a vacina contra poliomelite oral trivalente, vacina combinada contra sarampo, caxumba e rubéola, vacina tetravalente DTP e Hib conjugada, assim como a tradicional vacina contra febre amarela. Além, disso também são produzidos reagentes e insumos para diagnóstico laboratorial, dentre os quais kits para dengue, leishmania humana e canina, leptospirose e teste rápido para HIV tipos 1 e 2. Recentemente estarão sendo produzidos os biofármacos eritropoietina humana recombinante e interferon alfa 2b humano recombinante para uso humano. Desta forma, Bio-Manguinhos tem como missão “contribuir para a melhoria dos padrões de saúde pública brasileira, através da pesquisa e da produção de imunobiológicos capazes de atender à demanda gerada pelo quadro epidemiológico do País” (Bio-Manguinhos/Fiocruz 2007).

1.2 – Micoplasmas

1.2.1 – Classificação e estrutura genômica

O primeiro isolamento de micoplasma foi realizado por Nocard & Roux na França, em 1898, a partir de um surto de pleuropneumonia contagiosa bovina. As espécies descobertas posteriormente foram denominadas genericamente de PPLO (do inglês “pleuropneumonia like organisms”). Os micoplasmas e ureaplasmas estão classificados na classe dos *Mollicutes*, ou seja, pele suave do latim, em referência à ausência de parede celular bacteriana rígida (Domingues *et al.* 2005). A classe dos *Mollicutes* pode ser dividida em quatro ordens: a primeira composta pelas espécies dos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, a segunda abrange as espécies pertencentes aos gêneros *Entomoplasma*, *Mesoplasma* e *Spiroplasma*, a terceira pelo gênero *Acholeplasma* e finalmente, a quarta ordem compreende os gêneros *Anaeroplasma* e *Asteroleplasma* (tabela 1.1). Entretanto, resultados moleculares preliminares de caracterização dos microrganismos conhecidos como *mycoplasma like organisms* (MLO) apontam fortemente para a inclusão destes na classe dos *Mollicutes*, conseqüentemente o termo phytoplasmas vem sendo proposto para substituir a designação de MLOs (Razin *et al.* 1998). A quantidade de material genético que forma o genoma desses microrganismos é muito pequena, ou seja, os tamanhos dos genomas dos microrganismos da classe *Mollicutes* variam entre 600 e 2200 kpb. Entre os micoplasmas a variação peso molecular genômico ocorre entre 580 e 1380 kpb em *M. genitalium* e *M. mycoides*, respectivamente (Bove 1997 e Carle *et al.* 1995). Os tamanhos do genoma são variáveis não somente dentro do mesmo gênero, mas entre cepas da uma mesma espécie. Uma das razões para esta variabilidade é a freqüente ocorrência de elementos repetitivos nos genomas dos *Mollicutes*, consistindo em segmentos dos genes de proteínas, diferindo em tamanho e número, ou em elementos de inserção (Rocha *et al.* 2005). A variabilidade intraespecífica pode também ser causada pela integração de seqüências virais no cromossomo, como foram descritas em *Spiroplasma citri*, onde estas seqüências podem apresentar até 150 kpb, ou seja, 1/12 do genoma inteiro (Renaudin & Lartigue 2005).

Tabela 1.1: Taxonomia e principais características da classe *Mollicutes*.

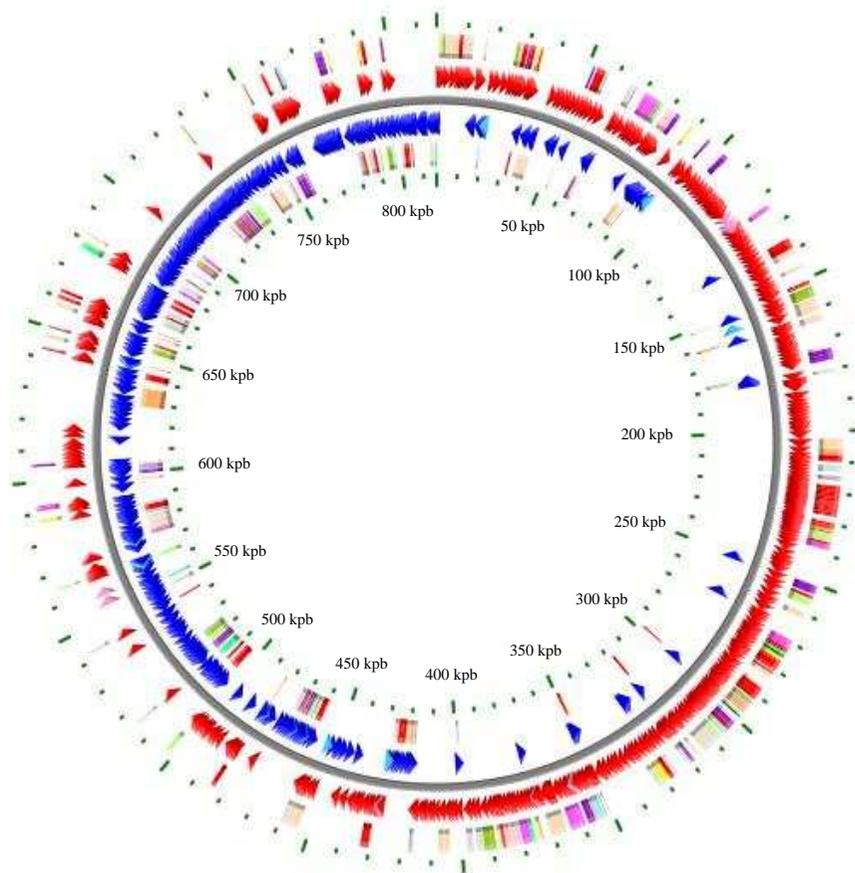
Classificação	Nº de espécies	Tamanho do genoma (kpb)	% GC do genoma	Requerimento por colesterol	Propriedades distintas	Habitat
Ordem I: <i>Mycoplasmatales</i>						
Família: <i>Mycoplasmataceae</i>						
Gênero I: <i>Mycoplasma</i>	102	580-1350	23-40	Sim	Crescimento ótimo a 37°C	Humanos e animais
Gênero II: <i>Ureaplasma</i>	6	760-1170	27-30	Sim	Hidrólise de uréia	Humanos e animais
Ordem II: <i>Entomoplasmatales</i>						
Família I: <i>Entomoplasmataceae</i>						
Gênero I: <i>Entomoplasma</i>	5	790-1140	27-29	Sim	Crescimento ótimo a 30°C	Insetos e plantas
Gênero II: <i>Mesoplasma</i>	12	870-1100	27-30	Não	Crescimento ótimo a 30°C; necessário 0,04% de Tween 80 em meios livres de soro	Insetos e plantas
Família II: <i>Spiroplasmataceae</i>						
Gênero I: <i>Spiroplasma</i>	33	780-2220	24-31	Sim	Filamentos móveis helicoidais; crescimento ótimo a 30-37°C	Insetos e plantas
Ordem III: <i>Acholeplasmatales</i>						
Família I: <i>Acholeplasmataceae</i>						
Gênero: <i>Acholeplasma</i>	13	1500-1650	26-36	Não	Crescimento ótimo a 30-37°C	Animais, algumas plantas e insetos
Ordem IV: <i>Anaeroplasmatales</i>						
Família I: <i>Anaeroplasmataceae</i>						
Gênero I: <i>Anaeroplasma</i>	4	1500-1600	29-34	Sim	Anaeróbios estritos	Rúmen bovino/ovino
Gênero II: <i>Asteroplasma</i>	1	1500	40	Não	Anaeróbios estritos	Rúmen bovino/ovino
Status taxonômico indefinido: <i>Phytoplasma</i>	Não definido	640-1185	23-29	Desconhecido	Não cultivados <i>in vitro</i>	Insetos e plantas

O genoma dos micoplasmas tem como característica uma baixa taxa de purinas (%GC). Com pouquíssimas exceções, o conteúdo GC nos genomas dos micoplasmas está entre 24 a 33%. Entretanto a %GC ao longo do genoma é desigual. Por exemplo, a porcentagem GC no genoma de *M. genitalium* é de 33%, sendo que no RNA ribossomal (rRNA) é 44% e no RNA transportador (tRNA) é de 52% (Fraser *et al.* 1995). Assim como em outros procariotos, alguns resíduos de adenina e citosina nos genomas dos micoplasmas são metilados (Dybvig & Voelker 1996). Os genes codificadores do rRNA talvez sejam os mais bem caracterizados entre os *Mollicutes*. As seqüências destes genes altamente conservados, particularmente o rRNA 16S, funcionam como uma das ferramentas mais importantes para filogenia, taxonomia e para diagnose. A organização do rRNA dos *Mollicutes* apresenta uma ordem característica como as eubactérias, ou seja, 16S-23S-5S, funcionando como um operon. Algumas exceções sobre a organização clássica do rRNA foram descritas, por exemplo, em *M. hyopneumoniae* e *M. flocculare* o rRNA 5S está separado do rRNA 16S-23S. Já a cepa de *M. gallisepticum* S6 apresenta dois operons do rRNA, um convencional com estrutura 16S-23S-5S e outra onde o rRNA 16S está separado do rRNA 23S-5S. A existência em *M. gallisepticum* cepa A5969, mas não em S6, de um pseudogene truncado do rRNA 16S foi reportada, porém não está claro como esta cópia truncada é expressa (Taschke *et al.* 1986, Stemke *et al.* 1994, Gorton *et al.* 1995 e Skamrov *et al.* 1995). Os genomas dos *Mollicutes* apresentam uma ou duas cópias do rRNA, diferentemente de *Clostridium ramosum* e *C. innocuum*, ou seja microrganismos filogeneticamente relacionados aos *Mollicutes* os quais apresentam quatro e cinco cópias respectivamente (Bove 1993). Entre os *Mollicutes*, os *Spiroplasmas* e *Acholeplasmas* são os mais frequentemente infectados por uma variedade de vírus (fagos), visto que uma grande quantidade de vírus pode infectar micoplasmas (Zou *et al.* 1995). Plasmídeos foram detectados em *S. citri* e mais recentemente em *M. mycoides* e em *Phytoplasmas*. O potencial de fagos e plasmídeos dos *Mollicutes* para servir como vetores foi o principal foco de interesse destes elementos (Namba *et al.* 2005).

Pela ausência de parede celular, seria esperada uma maior facilidade na introdução de DNA exógeno. De fato, a troca de DNA cromossômico durante o contato e a transposição conjugativa do transposon Tn916 de *Streptococcus faecalis* para *M. hominis*, provavelmente envolve a transiente fusão de membranas na zona de contato. Porém, a taxa de transferência nestes casos é bastante baixa (Renaudin & Lartigue 2005). A bem sucedida transformação de *M. pulmonis* e *A. laidlawii* para a resistência a antibióticos foi primeiramente alcançada pela aquisição do plasmídeo, pAM120 abrigando o transposon estreptocócico Tn916, que confere resistência a tetraciclina (Renaudin & Lartigue 2005). Desde o final dos anos 80, foram realizados vários estudos na construção de mapas físicos dos genomas dos *Mollicutes*, seguidos pelo seqüenciamento de fragmentos genômicos e experimentações para identificar seus genes (Bove 1993). O primeiro estudo em larga escala para seqüenciamento do genoma completo de um micoplasma foi iniciado por volta de 1990, utilizando para tanto, o *M. capricolum*. Quando este projeto foi finalizado em 1995, apenas 214 dos 1000 kpb estavam definidos seqüenciados e geneticamente analisados. O primeiro seqüenciamento completo foi realizado com *M. genitalium* em 1995 (Miyata *et al.* 1991, Bork *et al.* 1995 e Fraser *et al.* 1995).

Com a evolução das técnicas de seqüenciamento, atualmente estão disponíveis os sequenciamentos dos genomas completos de 10 diferentes espécies de micoplasmas, entre elas uma cepa de *M. pneumoniae* conforme a figura 1.1 (Stothard *et al.* 2005).

Mycoplasma pneumoniae, genoma completo



Acesso: NC_000912

Tamanho: 826,394; Genes 733

BacMap

Genes codificadores de proteínas

- Fita positiva
- Fita negativa

Genes codificadores de RNA ribossomal

- Fita positiva
- Fita negativa

Categorias Funcionais

Genes de processamento

- Tradução, estrutura ribossomal e biogênese
- Transcrição
- Replicação de DNA, recombinação e reparo

Genes dos processos celulares

- Divisão celular e partição cromossomal
- Modificação pós-traducional, processamento protéico e chaperonas
- Biogênese de envelope, membrana externa
- Secreção e mobilidade celular
- Metabolismo e transporte de íons inorgânicos
- Mecanismos de transdução de sinais

Genes do metabolismo

- Produção e conversão de energia
- Metabolismo e transporte de carboidratos
- Metabolismo e transporte de aminoácidos
- Metabolismo e transporte de nucleotídeos
- Metabolismo de coenzimas
- Metabolismo de lipídeos
- Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo

Genes de função geral predita apenas

- Função geral predita apenas
- Função desconhecida

Figura 1.1: Genoma completo de *M. pneumoniae*, seqüência NC_000912.

1.2.2 – Etiologia e patogenia

Micoplasmas estão distribuídos na natureza como parasitas de humanos, mamíferos, répteis, peixes, artrópodos e plantas. Geralmente apresentam hospedeiros estritos e especificidade por determinados tecidos, provavelmente refletindo sua verdadeira natureza nutricional e o modo de vida parasita praticamente obrigatório. Entretanto, existem numerosos exemplos da presença de micoplasmas em hospedeiros e tecidos diferentes de seus habitats convencionais (Razin *et al.* 1998). Uma vez que as células dos micoplasmas são envoltas apenas por uma membrana sua forma dominante é esférica. Entretanto, muitos Mollicutes apresentam uma variedade de formas, incluindo células em formato de pêra, células em formato de frasco com estruturas pontiagudas, filamentos de vários tamanhos e até filamentos helicoidais. A habilidade em manter estas estruturas na ausência de uma parede celular rígida tem indicado por muito tempo a presença de citoesqueleto em micoplasmas. Além disso, alguns micoplasmas com estruturas em forma de frascos apresentam capacidade de deslizamento, porém o mecanismo deste peculiar tipo de motilidade ainda não é bem definido. *M. pneumoniae* pode deslizar com uma velocidade de 0,3 a 0,4 $\mu\text{m/s}$ enquanto que *M. mobile* desliza de 2,0 a 4,5 $\mu\text{m/s}$ (Miyata 2005). Algumas espécies possuem cápsula, porém não possuem esporos, fímbrias, corpúsculos de inclusão ou flagelos. Os micoplasmas são considerados os menores microrganismos de vida livre e as suas dimensões, em geral, estão próximas às dos maiores vírus. Diferem das formas-L bacterianas, as quais não apresentam parede celular, temporariamente por reflexo de condições ambientais. Estes microrganismos também são muito menores que a maioria das bactérias (Figura 1.2). Células de micoplasmas são muito pequenas e bastante pleomórficas, além disso, uma mesma cultura pode apresentar pequenos elementos cocóides e formas filamentosas de comprimentos variados. Pequenos elementos cocóides de 0,2 a 0,3 μm são as menores unidades de micoplasmas capazes de se multiplicar (Madigan *et al.* 2000 e Waites *et al.* 2001).

Os micoplasmas provenientes de seres humanos pertencem aos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, este último inclui espécies capazes de hidrolisar uréia (Waites *et al.* 2001). Micoplasmas associados a seres humanos variam de células cocóides entre 0,4 e 0,5 μm , como por exemplo, *Ureaplasma sp.* e *M. hominis*, a células em formato alongadas com 1-2 μm de comprimento e 0,1 a 0,2 μm de largura como *M. pneumoniae*. Sendo assim sob pressão e sem parede celular estes microrganismos podem atravessar filtros bacteriológicos de 0,22 μm e manter sua viabilidade (Waites *et al.* 2001, Timenety *et al.* 1992 e Uphoff & Drexler 2002^a).

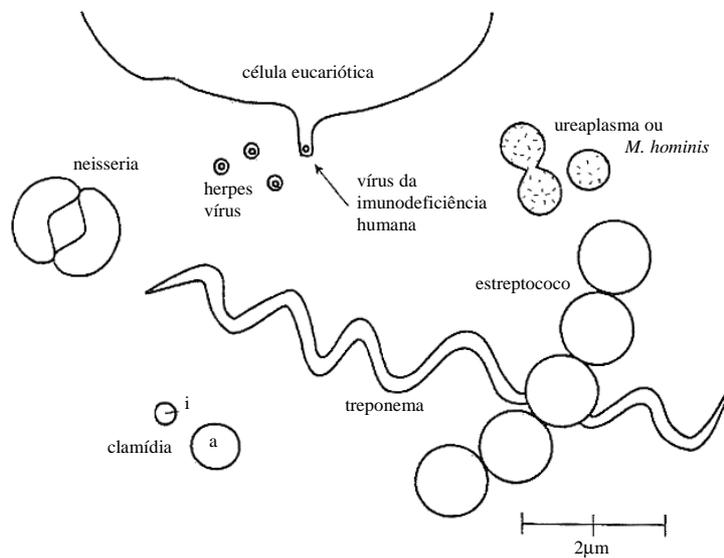


Figura 1.2: Tamanho relativo de *M. hominis* e *Ureaplasma sp.* comparado a outros microrganismos.

Devido ao seu baixo “conteúdo” genético, esses os micoplasmas possuem uma capacidade biossintética limitada. Em conseqüência, o cultivo de micoplasmas e ureaplasmas, requer meio enriquecido contendo precursores para a biossíntese de ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos. Para o cultivo desses microrganismos os precursores de ácidos nucléicos e proteínas são geralmente proporcionados pelo enriquecimento com peptona e extrato de levedura, já os lipídeos pela inclusão de soro de animais.

De fato, um dos principais critérios empregados na classificação taxonômica desses microrganismos é o requerimento do complexo colesterol-lipídeos, no meio de crescimento. Em meios sólidos, geralmente produzem colônias em “forma de ovo frito” que pode ser observada em lupas com um aumento de 50 vezes. Em cultivo líquido, raramente turvam o caldo, mesmo em concentração de 10^8 células /mL (Koneman *et al.* 2001). Os micoplasmas podem ser divididos em fermentadores e não fermentadores de carboidratos (glicose). Os fermentadores acidificam os meios de cultura, já os não fermentadores, oxidam ácidos graxos e álcoois, não diminuindo significativamente o pH da cultura *in vitro*. Quando a arginina é utilizada há produção de ATP, CO₂ e NH₃, alcalinizando o meio. Usualmente o pH ótimo para o crescimento “*in vitro*” é de $7,8 \pm 0,2$. (Koneman *et al.* 2001).

A maioria dos *Mollicutes* vive como comensais e em muitos artrópodes são considerados simbiontes. Infecções com micoplasmas patogênicos raramente são do tipo fulminante, porém geralmente levam à infecção crônica. Um ponto a ser discutido é que os micoplasmas poderiam ser considerados como “parasitas ideais”, frequentemente vivendo em harmonia com seus hospedeiros (Markham & Noormohammadi 2005). A maioria das espécies de micoplasmas é de origem animal e, portanto, existe uma grande diversidade na relação entre parasita-hospedeiro. Os micoplasmas são importantes patógenos aviários, responsáveis por doenças respiratórias e articulares, acarretando grandes perdas econômicas na avicultura mundial. As micoplasmoses aviárias apresentam-se como um dos principais problemas sanitários na cadeia produtiva avícola e dentre as espécies isoladas, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* e *M. iowae* são considerados os principais agentes patogênicos para galinhas e perus. As micoplasmoses acarretam em enormes perdas econômicas devido ao decréscimo da taxa de crescimento, no ganho de peso, por condenações de carcaças devido à doença respiratória crônica, bem como a redução na produção e eclodibilidade de ovos, além dos custos com profilaxia e uso de drogas terapêuticas (Medina & Charlton 1994).

M. pneumoniae ocorre endemicamente e epidemicamente em pessoas de todas as idades. A transmissão ocorre através do contato com gotículas do nariz ou da garganta de pessoas infectadas, especialmente quando estas tosse ou espirram (aerossóis). A síndrome clínica mais freqüente é a traqueobronquite, frequentemente acompanhada de sintomas no trato respiratório superior. Queixas típicas podem persistir de semanas a meses e incluem mal-estar, febre, rouquidão, tosse, dores de cabeça e garganta, coriza e em alguns casos complicações extra-pulmonares. Este patógeno é responsável por 20% das pneumonias com internação hospitalar nos Estados Unidos (Waites *et al.* 2001 e Domingues *et al.* 2005).

A maioria dos micoplasmas animais adere tenazmente às células epiteliais do trato respiratório e urogenital, raramente invadindo tecidos. Sendo assim, podem ser considerados, como parasitas de superfície. A adesão dos *Mollicutes* às células hospedeiras é um pré-requisito para colonização e infecção. As mais bem caracterizadas adesinas, componentes de membrana responsáveis pela adesão, estão relacionadas às espécies de *M. pneumoniae* e *M. genitalium* (Citti *et al.* 2005). A localização intracelular dos *Mollicutes* em tecidos de insetos é conhecida. Quando micoplasmas humanos e animais foram observados dentro de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos então foi levantada a questão sobre a possibilidade da entrada destes em células epiteliais. Foi demonstrada a localização intracelular de *M. fermentans* incógnitos em uma variedade de células não fagocíticas em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. Este apontamento reforçou a pesquisa e a descoberta de um novo tipo de micoplasma humano capaz de invadir uma grande variedade de células humanas *in vitro* e *in vivo* denominado *M. penetrans*. A porcentagem da população de micoplasmas internalizados é difícil de determinar. A partir da microscopia eletrônica de células Vero *in vitro* foi demonstrada a presença intracelular em 10% das células infectadas por *M. genitalium* (Citti *et al.* 2005).

Adicionalmente, os micoplasmas são responsáveis por inoportunas e persistentes infecções em células de cultivo primário ou de linhagem. Esses microrganismos causam alterações no metabolismo, diminuição na taxa de divisão celular pela interferência na síntese de DNA, RNA e proteínas, aberrações cromossômicas e morte com desprendimento da monocamada. Podem ainda induzir à redistribuição e modificação dos antígenos de superfície na membrana da célula hospedeira, interferindo na propagação de vírus. As espécies mais frequentes em cultivo celular são: *Acholeplasma laidlawii*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. fermentans* e *M. hyorhinis*. A infecção por micoplasmas em culturas celulares traz prejuízos consideráveis aos laboratórios de pesquisa, bem como às indústrias farmacêuticas e biotecnológicas que utilizam sistemas celulares para produção de insumos biológicos (Uphoff e Drexler 2002^b).

O íntimo contato entre os micoplasmas e as células hospedeiras pode acarretar numa local e transiente fusão de membranas ou troca dos componentes da membrana e até injeção do conteúdo citoplasmático dos micoplasmas, incluindo enzimas hidrolíticas. Assim, as potentes nucleases dos *Mollicutes* combinada aos radicais superóxidos pode ser responsável por efeitos clastogênicos nas células, ou seja, quebra dos cromossomos que podem resultar no ganho, na perda, ou em rearranjos genéticos (Razin *et al.* 1998). Uma questão fundamental é levantada sobre a possibilidade dos micoplasmas em induzir neoplasias. Micoplasmas parecem ser os únicos procariotos que podem crescer “simbioticamente” com hospedeiros eucarióticos e apresentar uma estreita relação com células de mamíferos por longos períodos. Interações íntimas entre os micoplasmas e a superfície celular podem desencadear cascatas de sinais da membrana ao núcleo celular, alterando a função de vários genes. Além disso, micoplasmas são conhecidamente indutores de uma variedade de citocinas que podem efetivamente mediar uma larga escala de ações biológicas na proliferação e diferenciação celular (Tsai *et al.* 1995).

Estas bactérias possuem alta sensibilidade aos agentes descontaminantes químicos e físicos. São também sensíveis aos detergentes e alterações osmóticas, no entanto, a ausência de parede celular bacteriana típica contendo glicopeptídeos torna esses microrganismos insensíveis a agentes antimicrobianos ativos contra parede celular, como penicilinas e cefalosporinas (Taylor-Robinson & Bébéar 1997).

1.2.3 – Filogenia

Morfologicamente e microbiologicamente, os *Mollicutes* são classificados como *eubacterias* os quais provavelmente são derivados de *lactobacilli*, *bacilli* ou *streptococci* por evolução regressiva e redução de genoma, para produzir as menores e mais simples células auto-replicas de vida livre. Estruturalmente, os *Mollicutes* são caracterizados pela completa ausência de parede celular e presença esteróis na membrana citoplasmática. Baseadas em dados sobre o rRNA 16S, a taxonomia, assim como a filogenia e a evolução destes microrganismos vem sendo discutidas. Mais de 100 espécies foram descritas e o seu número assim como o número de hospedeiros vem aumentando. Por análise filogenética, baixo teor GC, as bactérias Gram-positivas do filo *Firmicutes* apresentam-se em três classes *Bacilli*, *Clostridia* e *Mollicutes*. Entretanto, baseado no rRNA 16S apenas os *Mollicutes* neste filo, são pertencentes à uma clade monofilética, ou seja, derivam de uma única espécie ancestral (Wolf *et al.* 2004 e Stakenborg *et al.* 2005).

Devido à importância das seqüências de rRNA 16S tanto na filogenia, taxonomia, quanto na identificação das espécies de *Mollicutes*, o Comitê de Taxonomia em *Mollicutes* recomenda a inclusão da seqüência de rRNA 16S em quaisquer descrições de novas espécies desta classe. A mais importante contribuição das seqüências de rRNA 16S para a filogenia e taxonomia dos *Mollicutes* vem sendo empregada em agrupar os *Phytoplasmas* como uma clade monofilética estreitamente relacionada aos *Acholeplasmas* (Thiaucourt & Roger 2005).

Mesmo que as seqüências de rRNA 16S tenham sido comprovadamente ferramentas muito eficientes na filogenia e taxonomia dos *Mollicutes*, acredita-se que marcadores filogenéticos adicionais são desejáveis para suportar as conclusões baseadas pela análise do rRNA 16S. De fato estes marcadores já estão sendo aplicados, incluindo proteínas ribossomais conservadas, o gene que codifica para o fator de alongação EF-Tu e as seqüências intergênicas do RNA 16S-23S (Thiaucourt & Roger 2005).

1.2.4 – Diagnóstico clássico e molecular

Métodos disponíveis para o diagnóstico de infecções causadas por micoplasmas incluem o método direto, coloração de DNA, ELISA, imunofluorescência, ensaios bioquímicos, ensaios com sondas de DNA, entre outros. Embora cada um destes métodos esteja associado a algumas vantagens, os procedimentos imunológicos são frequentemente limitados pela reatividade cruzada entre espécies. Além disso, devido aos requerimentos nutricionais, o cultivo destes microrganismos fastidiosos tende a ser demorado e laborioso. A maioria dos procedimentos de detecção disponíveis não é suficiente para a detecção simultânea da maior parte das espécies de micoplasmas contaminantes encontradas em culturas de células. Na tentativa de contornar estas limitações muitos procedimentos moleculares têm sido desenvolvidos (Sung *et al.* 2006). Métodos baseados na reação de PCR, para a detecção de algumas regiões do genoma dos micoplasmas, tem demonstrado rapidez e especificidade. Entretanto, o grau de sensibilidade destas técnicas tende a ser baixo, quando as seqüências de oligonucleotídeos iniciadores não complementam perfeitamente com o DNA alvo das diferentes espécies. Portanto, oligonucleotídeos iniciadores têm sido desenvolvidos especialmente para se ligar à região conservada do DNA que codifica para o RNA ribossomal 16S ou nas regiões intergênicas do rDNA 16S-23S dos micoplasmas. Estes procedimentos estão associados a sensibilidades distintas, tendo em vista as diferentes espécies e as diferentes metodologias.

As seqüências nucleotídicas dos genes que codificam para o RNA ribossomal de várias espécies de micoplasmas têm sido determinadas e utilizadas para construir uma base filogenética sistemática destes microrganismos. Alinhamentos *in silico* das seqüências do RNA ribossomal revelaram a existência de regiões altamente conservadas permitindo a seleção de oligonucleotídeos iniciadores para detectar diferentes espécies de micoplasmas (van Kuppeveld *et al.* 1992, van Kuppeveld *et al.* 1994, Teyssou *et al.* 1993, Kong *et al.* 2001, Uphoff & Drexler 2002^a, Uphoff & Drexler 2002^b, Eldering *et al.* 2004, Sung *et al.* 2006 e Timenetsky *et al.* 2006).

De forma a aumentar a eficiência no controle de contaminantes microbianos no produto final, seria ideal a utilização de testes cada vez mais sensíveis, específicos e rápidos. A execução dos testes convencionais atualmente empregados no LACOM, para detecção de micoplasmas, é muito laboriosa e demanda muito tempo para a liberação dos resultados em cada fase da produção. Portanto, assim como o desenvolvimento de vacinas tem evoluído, o mesmo pode e deve ocorrer com as tecnologias utilizadas para o controle de qualidade, as quais devem assegurar a qualidade e a eficácia dos imunobiológicos. As limitações dos métodos convencionais, face à demora no tempo de liberação dos resultados, assim como à dificuldade de detecção de contaminantes presentes em baixas concentrações, poderiam ser solucionadas pela utilização de testes moleculares. O primeiro teste baseado em ácidos nucléicos, bem delineado e aceito para uso pelo Food and Drug Administration (FDA) foi o Gen-Probe Pace em 1988, para detecção de *Chlamydia* e gonococos utilizando a hibridização de ácidos nucléicos (Gen-Probe Inc. 2007). Nos anos subseqüentes, testes baseados na amplificação de ácidos nucléicos foram desenvolvidos para detectar virtualmente todos os bioagentes clinicamente relevantes. As vantagens dos testes baseados em ácidos nucléicos sobre os métodos microbiológicos incluem a rapidez de resultados aliada aos baixos níveis de detecção (teoricamente uma única célula) e detecção alvo-específica. Devido à alta sensibilidade dos testes baseados na amplificação de ácidos nucléicos, a prevenção de eventuais contaminações, assim como a inserção de controles de reação deve ser implementada sempre (Mothershed & Whitney 2006).

Teoricamente nos testes baseados na amplificação de ácidos nucleicos, uma cópia do gene alvo pode ser amplificada; portanto, se esta cópia for proveniente de uma contaminação laboratorial, um resultado falso-positivo será evidenciado. Todavia, inibidores provenientes das amostras clínicas ou mesmo a degradação do DNA podem gerar um resultado falso-negativo. Uma consideração sobre este tipo de metodologia é a não inferência sobre a viabilidade dos patógenos (Mothershed & Whitney 2006).

Dellepiane e colaboradores (2000) destacam que o controle de qualidade de vacinas sempre confiou em três componentes básicos: 1) controle das matérias-primas; 2) controle do processo produtivo e 3) controle do produto final. Em geral, os laboratórios de controle de qualidade de imunobiológicos têm obtido maior êxito em assegurar a qualidade dos substratos celulares, devido à experiência adquirida com as vacinas tradicionais. Procedimentos para testar contaminantes virais em vacinas produzidas a partir de culturas de células têm sido realizados consideravelmente nos últimos anos. A utilização da reação de PCR revolucionou a habilidade em detectar pequenas quantidades de partículas virais específicas como contaminantes. Todavia, como esta técnica, não detecta apenas partículas virais íntegras, mas também, parte dos genomas virais, sendo assim muito cuidado deve existir na avaliação dos resultados assim como nas suas implicações sobre a segurança dos produtos. Portanto, é necessário assegurar a competência e a padronização das técnicas moleculares, como PCR, para inserção na rotina dos laboratórios de controle de qualidade.

A utilização da reação de PCR para detecção de micoplasmas, para Controle de Qualidade de imunobiológicos, ainda não consta nos requerimentos da OMS, porém é permitida a utilização de metodologias alternativas desde que seja comprovada a equivalência frente às metodologias tradicionais (WHO 1998^a).

No Japão, são produzidos cinco tipos de vacinas virais para uso humano (sarampo, caxumba, rubéola, sarampo e rubéola combinada e poliomielite oral). Estas vacinas são produzidas utilizando culturas celulares. O teste de esterilidade pelo método direto para micoplasmas, que são contaminantes comuns em culturas celulares, é utilizado para testar os produtos intermediários de diferentes etapas do processo produtivo destas vacinas. Mesmo que muitos novos métodos tenham sido desenvolvidos para detectar micoplasmas em amostras biológicas nas últimas duas décadas, o método direto continua a ser imprescindível na garantia da ausência de micoplasmas no produto final. Contudo, pequenas concentrações de antibióticos como canamicina, estreptomicina e/ou eritromicina são utilizadas para prevenir contaminações bacterianas durante a cultura de vírus em larga escala. Conseqüentemente, caso ocorram contaminações por micoplasmas nas vacinas, a detecção destes patógenos (viáveis) é bastante difícil pelo método direto (Sasaki *et al.* 1996).

Atualmente a farmacopéia japonesa descreve a utilização e métodos moleculares (nested-PCR) para a detecção de micoplasmas em substratos celulares utilizados na produção de insumos biológicos e biotecnológicos. Inclusive são descritos exemplos de iniciadores oligonucleotídeos, assim como outras particularidades da metodologia (Japanese Pharmacopeia 2001).

Infecções por micoplasmas podem induzir uma variedade de problemas em organismos vivos e em culturas de células "*in vitro*". Muitas espécies consideradas comensais estão associadas a certas doenças que frequentemente são sub-clínicas. Essas infecções inaparentes tendem a ser insidiosas, uma vez que afetam uma série de aspectos genéticos e bioquímicos das células infectadas, induzindo resultados experimentais não confiáveis e a possível transmissão de doenças (Sung *et al.* 2006).

Portanto, é necessário estabelecer um protocolo para o diagnóstico rotineiro das infecções causadas por micoplasmas para assegurar a confiabilidade dos resultados, assim como a segurança de produtos biológicos comerciais. Entretanto, a detecção de espécies de micoplasmas em cultura de células constitui um grande problema, apesar dos investimentos substanciais que têm sido realizados recentemente em metodologias bioquímicas, imunológicas e moleculares para o diagnóstico destes agentes infecciosos.

Sendo assim, uma das propostas do Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos (DEQUA) é implementar metodologias de biologia molecular, baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR), entre outras, que modernizem e agilizem o controle de qualidade com relação à pesquisa de agentes adventícios.

1.3 – Produção e controle de qualidade da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz

Dentre as vacinas produzidas ou formuladas por Bio-Manguinhos, destacamos a vacina contra Febre amarela que no ano de 2001 obteve certificação nacional em Boas Práticas de Fabricação (BPF) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esta certificação levou à pré-qualificação pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e, desde então, a vacina contra febre amarela é exportada através de organismos internacionais, como *The United Nations Children's Fund* (UNICEF) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) para mais de 50 países. De forma resumida, a vacina contra febre amarela é produzida em ovos embrionados *Specific Pathogen Free* (SPF) inoculados com vírus da febre amarela, cepa 17DD, proveniente de um lote semente de trabalho, de acordo com os requerimentos da OMS (WHO 1998^b). Os ovos são incubados em temperatura e umidade controlada, durante três dias. Os embriões viáveis são coletados, triturados, centrifugados e são adicionados L-glutamato de sódio e sacarose. Esta suspensão é então congelada. São coletadas amostras e realizados testes de controle de qualidade a cada etapa da produção. Depois da aprovação nos testes de controle, a suspensão viral é descongelada, e no caso da vacina 5 doses, são adicionadas outras substâncias estabilizadoras (gelatina hidrolisada, L-glutamato de sódio e sorbitol), originando o produto acabado a granel (PAG). Cada dose (0,5 mL) deve ter mais que 1000 MLD50, *mouse letal dose*, ou equivalente em PFU, *plaque forming units* (título mínimo estabelecido pela OMS). Após a formulação, a vacina passa por um processo de secagem, denominado liofilização. A vacina é comercializada na forma liofilizada e deve ser reconstituída em volumes apropriados para o uso, conforme figura 1.3 (Almeida 2005).

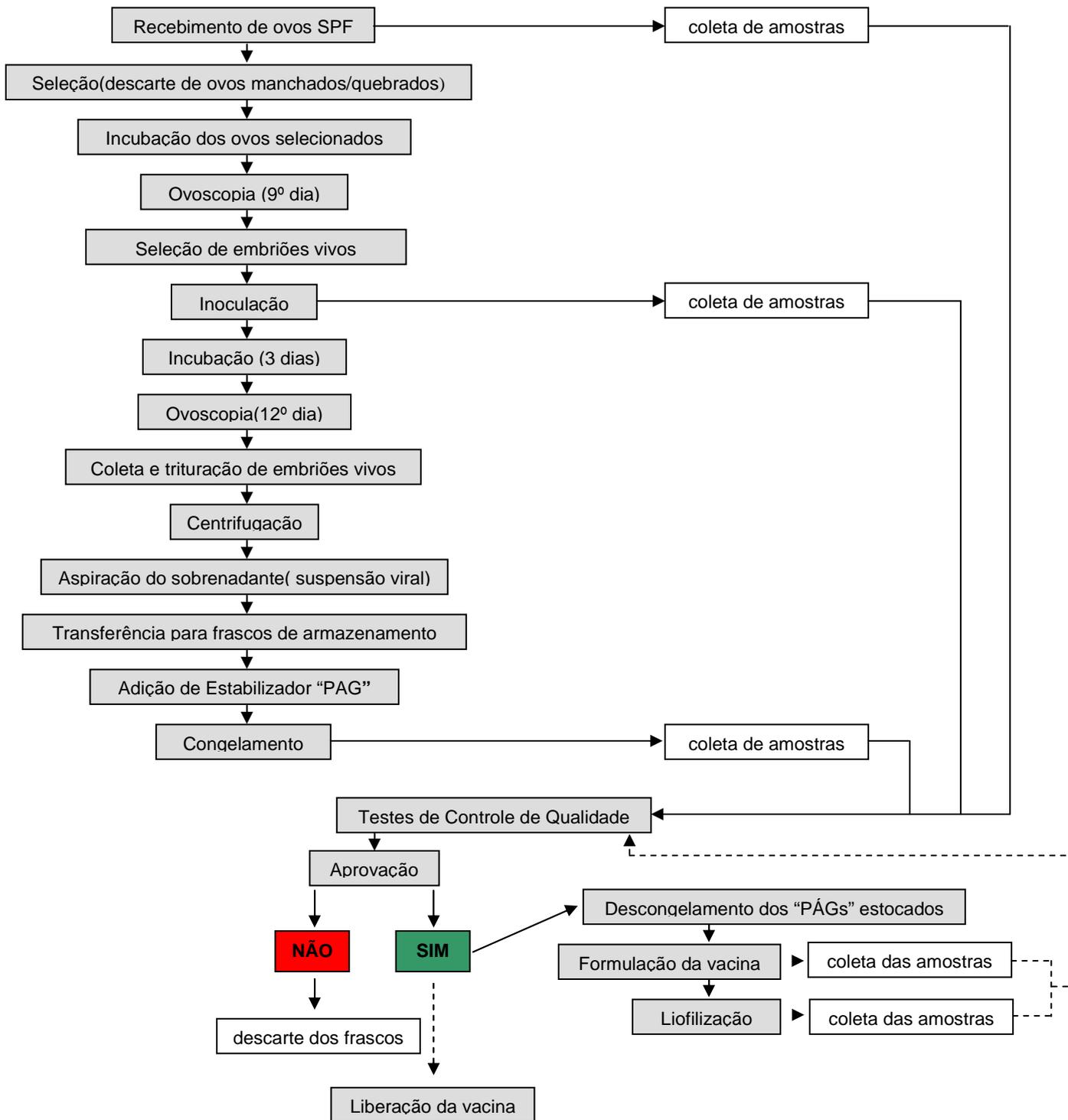


Figura 1.3: Fluxograma da produção da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Os testes de controle de qualidade para a vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos são realizados no Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) pelo Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM), Laboratório de Controle Físico Químico (LAFIQ), Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) e Laboratório de Neurovirulência (LANEU). Os testes realizados pelo LACOM nas diversas etapas de produção da vacina de febre amarela estão sumarizados na tabela 1.2 (WHO 1998^b).

Tabela 1.2 - Testes realizados pelo LACOM para assegurar a qualidade da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos.

Etapa produtiva	Diluyente	Ovos SPF	Inóculo	Suspensão Viral	Produto Acabado a Granel	Produto Final
Análise						
Esterilidade (filtração em membrana) ¹	X					X
Endotoxina ²	X					X
Reação de Aglutinação ³		X				
Precipitação em agar ⁴		X				
ELISA ⁵		X				
Inibição de Hemaglutinação ⁶		X				
Esterilidade (inoculação direta) ⁷			X	X	X	
Potência ⁸				X	X	X
Detecção de micobactérias ⁹				X		
Detecção de micoplasmas ¹⁰				X	X	
Termoestabilidade ¹¹						X
Identidade ¹²						X
Ovoalbumina ¹³						X

¹ Esterilidade (filtração em membrana), confirmar a ausência de microrganismos (bactérias e fungos).

² Endotoxina, determinação da concentração de endotoxina através da utilização do LAL (*Limulus ameobocyte lysate*).

- ³ Reação de aglutinação, detecção no soro das aves de anticorpos contra salmonela e micoplasmas aviários.
- ⁴ Precipitação em agar gel, detecção de anticorpos específicos contra vírus aviários.
- ⁵ ELISA (*Enzyme linked Immunosorbent assay*), ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos para os vírus do complexo leucócito aviário.
- ⁶ Inibição de hemaglutinação (HI), detecção no soro das aves de anticorpos específicos de vírus aviários hemaglutinantes.
- ⁷ Esterilidade (inoculação direta), confirmar a ausência de microrganismos contaminantes (bactérias e fungos).
- ⁸ Potência, determinar a concentração de partículas virais na suspensão pelo método de PFU (*Plaque Forming Unit*).
- ⁹: Detecção de micobactérias, confirmar a ausência de contaminação por *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium*.
- ¹⁰: Detecção de micoplasmas, confirmar a ausência de micoplasmas.
- ¹¹ Termoestabilidade, verificar a perda do título de vírus ao final de 14 dias em amostras de vacinas mantidas a 37°C.
- ¹² Identidade, confirmar a identidade do vírus utilizando anti-soro específico contra o vírus da Febre Amarela, em teste de soroneutralização.
- ¹³ Ovoalbumina, detecção da ovoalbumina residual por ELISA

Para a detecção de micoplasmas nos produtos intermediários da vacina contra a febre amarela é utilizada atualmente pelo Setor de Esterilidade (SEEST) a técnica convencional de inoculação, dos produtos intermediários da vacina contra febre amarela, em meios de cultura líquidos e sólidos (método direto). Os meios de cultura utilizados nestes ensaios são preparados pelo Setor de Meios de Cultura (SEMEC) e devem ser aprovados pelo Setor de Processos e Insumos (SEPIN) que avaliam a capacidade de cada lote de meio de cultura em promover o crescimento de cepas de micoplasmas de referência (Bio-Manguinhos/Fiocruz^a).

Conforme recomendações da Organização Mundial de Saúde, o teste de detecção de micoplasmas pelo método direto consiste em inocular o produto a ser testado em duas placas de meio de cultura, assim como inocular o produto a ser testado em dois tubos contendo meio líquido. Incubar pareadamente, tubos e placas em aerobiose e anaerobiose. Devem ser sempre incubados nestas mesmas condições meios líquidos e sólidos não inoculados para servirem como controles negativos. No segundo ou terceiro dia de incubação dos meios líquidos, após análise visual dos tubos e microscópica das placas, deve-se realizar a primeira sub-cultura a partir do tubo para novas placas.

No sétimo dia, novamente após análise visual dos tubos e microscópica das placas, deve-se realizar uma segunda sub-cultura. No décimo quarto dia de incubação, após análise prévia dos tubos e placas, realizar o terceiro e último repique para novas placas.

Todos os tubos e placas devem ser visualizados semanalmente e devem ser incubados por não menos de 21 dias em aerobiose e anaerobiose. Ademais, a cada teste devem ser inseridos controles positivos de quatro cepas de micoplasmas, *M. gallisepticum*, *M. orale*, *M. synoviae* e *M. pneumoniae*. Portanto, a metodologia apresenta-se bastante laboriosa e demorada levando 35 dias entre as primeiras inoculações e a liberação do resultado de acordo com o esquema da figura 1.4 (WHO, 1998^a e Bio-Manguinhos/Fiocruz^c).

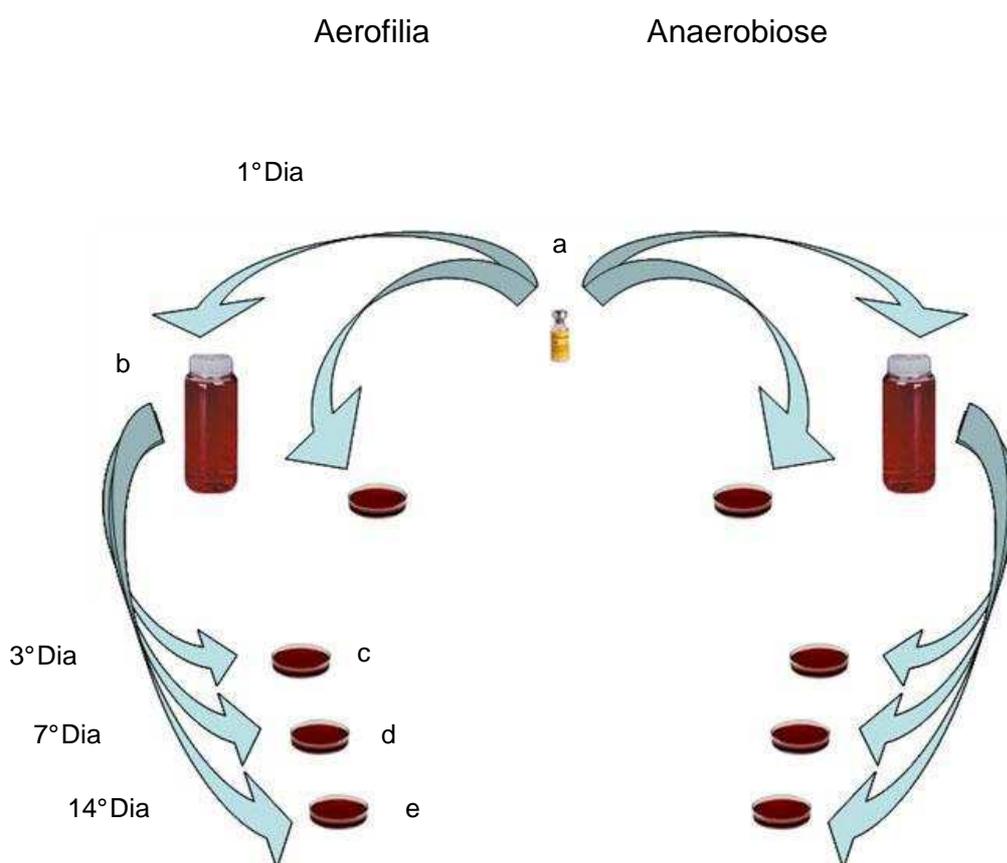


Figura 1.4: Ilustração esquemática do teste de detecção de micoplasmas pelo método direto: a) produto intermediário da vacina contra febre amarela, b) meio líquido, c) 1º repique, d) 2º repique e e) 3º repique.

A detecção de micoplasmas pelo método direto é efetuada pela visualização, em microscópio convencional ou estereomicroscópio, de colônias características em formato de "ovo frito" (Figura 1.5).

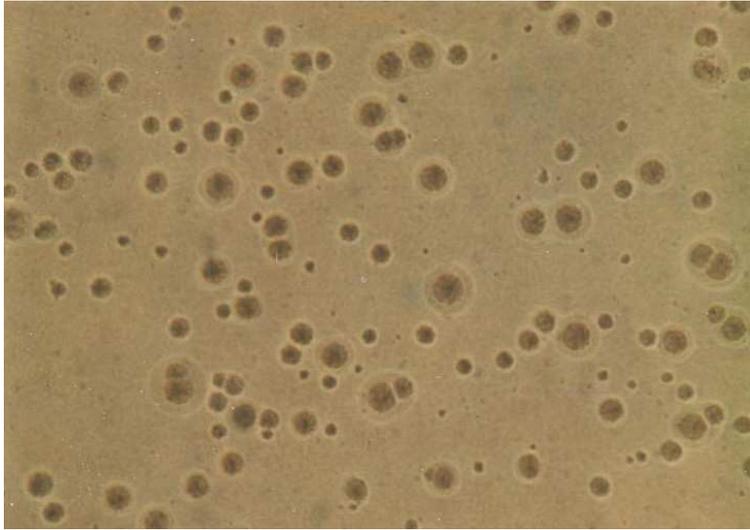


Figura 1.5 - Fotografia de uma cultura *M. pneumoniae* em meio sólido (agar), observada por microscopia convencional (aumento de 100X).

No LACOM alguns substratos utilizados na produção de vacinas, são testados rotineiramente no Setor de Testes Bioquímicos e Moleculares (SETBM) pela técnica de coloração de ácidos nucléicos como, por exemplo, o produto intermediário da vacina contra o sarampo, culturas de células e soros fetais bovinos. Esta metodologia visa detectar micoplasmas, utilizando cultura de células VERO ou CEF e o corante 4'-6'-diamino-2-fenil-indol-fluorocromo (DAPI) que será visualizado por microscopia de fluorescência (Bio-Manguinhos/Fiocruz^b). Resumidamente, a técnica de coloração de DNA consiste em inocular o produto a ser testado em uma cultura de células, incubar por 2 dias e evidenciar a presença ou ausência de micoplasmas utilizando fixadores e corantes de DNA (Bio-Manguinhos/Fiocruz^b). A leitura dos resultados é realizada pela observação em microscópio de fluorescência. O resultado é considerado negativo, quando somente os núcleos das células aparecerem corados em azul (Figura 1.6) e é considerado positivo, quando os núcleos das células aparecerem corados em azul, mais granulações fluorescentes no citoplasma, caracterizando a contaminação por micoplasmas (Figura 1.7).

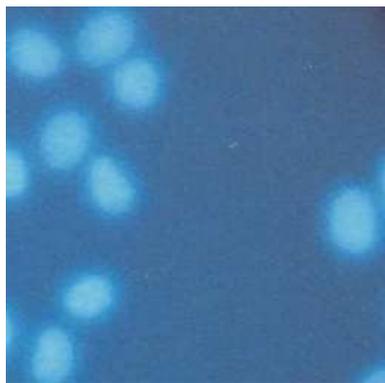


Fig. 1.6 - Fotografia, a partir de microscópio de fluorescência, de uma cultura de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) analisadas pelo DAPI.

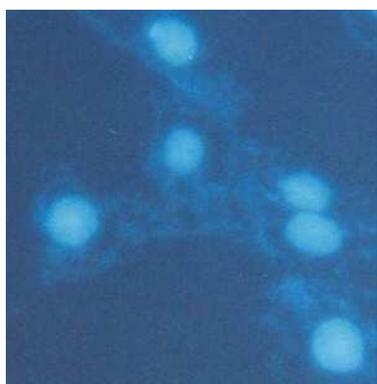


Fig. 1.7- Fotografia, a partir de microscópio de fluorescência, de uma Cultura de fibroblastos de embrião de galinha (CEF), infectados com *M. gallisepticum*, analisadas pelo DAPI.

Os micoplasmas, nas culturas celulares, são encontrados em associação com a membrana celular, no meio intercelular ou mesmo livres no meio. A coloração com o DAPI identifica micoplasmas como filamentos fluorescentes. Contudo, deve haver cautela na interpretação dos resultados, pois pequenos fragmentos nucleares de células mortas, assim como a presença de bactérias ou outros microrganismos podem se confundir com micoplasmas (Polak *et al.*1987).

2 – OBJETIVOS

2.1 – Geral

Desenvolvimento e padronização de metodologias baseadas em técnicas de biologia molecular (reação em cadeia da polimerase) para a detecção de micoplasmas em produtos intermediários das etapas do processo de produção da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz, de forma a assegurar com maior rapidez a ausência deste agente adventício no produto final.

2.2 – Específicos

- 1) Testar diferentes metodologias para extração de DNA para os produtos intermediários da Vacina contra Febre Amarela;
- 2) Estabelecer bancos de micoplasmas de referência (quantificados) de forma a assegurar a sensibilidade e especificidade do teste;
- 3) Estabelecer o limite de detecção do PCR em paralelo com o método clássico (cultura) para os produtos intermediários da Vacina contra Febre Amarela;
- 4) Desenvolver um ensaio de polimorfismo do comprimento dos fragmentos da restrição (RFLP) para diferenciar as amostras de micoplasmas utilizadas.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Apresentação

Os experimentos foram desenvolvidos em Bio-Manguinhos, na Vice-Diretoria de Qualidade, no Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM), especificamente no Setor de Testes Bioquímicos e Moleculares, em colaboração com laboratórios da Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC). Os experimentos de PCR assim como a eletroforese em géis de agarose, as digestões com enzimas de restrição e as reações de seqüenciamento foram realizados nos Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) e Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER). Os meios de cultura foram formulados pelo Setor de Meios de Cultura (SEMEC) e preparados conforme descrito no item 3.4, seguindo normas de controle de qualidade já estabelecidas pela instituição. Instalações e equipamentos foram certificados calibrados e aprovados para uso em laboratório, de acordo com as normas de qualidade do Laboratório de Metrologia e Validação do Departamento de Garantia da Qualidade (LAMEV/DEGAQ/Bio-Manguinhos). O trabalho com os organismos infecciosos seguiu as recomendações da Comissão Técnica de Biossegurança da FIOCRUZ para manipulação de microorganismos patogênicos.

3.2 – Cepas bacterianas

Foram utilizadas as cepas bacterianas *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. orale* (SEPIN Bio) gentilmente cedidas pelo Professor Jorge Timenetsky da Universidade de São Paulo, cultivadas e estocadas pelo Setor de Processos e Insumos (SEPIN). Também foram utilizadas as cepas de referência *M. gallisepticum* (ATCC 15302) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492), adquiridas da Coleção Americana de Cultura e Depósito (ATCC) e *M. synoviae* (CR 538631), obtida dos Laboratórios Charles River, Boston USA (CR). Os micoplasmas foram cultivados em tubos e placas contendo 10mL de meio de cultura cada. O número de passagens das cepas de referência foi limitado, ou seja, foram construídos lotes semente de cada uma das cepas de referência na 4ª passagem.

Foram utilizadas para o controle de especificidade, as cepas de gêneros não pertencentes aos *Mollicutes* obtidas da Coleção Americana de Cultura e Depósito (ATCC), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

3.3 – Produtos intermediários utilizados

Foram utilizados os produtos intermediários da vacina contra febre amarela, produto acabado a granel (PAG) e suspensão viral dos seguintes lotes: 054VFA035Z, 054VFA036Z, 054VFA037Z, 06OVFA104Z, 06OVFA107Z, 071VFA005Z, 05FCE028, 05FCE029, 05FCE030, 05FCE043, 05FCE044 e 05FCE049.

3.4 – Meios de cultura

Para promover o crescimento dos micoplasmas de origem humana (*M. pneumoniae* e *M. orale*) e de origem aviária (*M. gallisepticum* e *M. synoviae*) o meio de Frey modificado (Frey *et al.* 1968 e Medina & Charlton 1994) foi adaptado, neste trabalho. Este meio foi denominado PPLO (do inglês, “Pleuro Pneumonia Like Organism”) e foram produzidos meios líquidos e sólidos pelo Setor de Meios de Cultura (SEMEC) de Bio-Manguinhos.

Meio PPLO:

Reagente	Concentração Final	Fabricante/País
Caldo Base para Micoplasma	22,5 g/L	(Beckton, Dickinson, Phoenix, USA)
Suplemento	25% (v/v)	

Nos meios sólidos foi adicionado base Agar Nobre (Beckton, Dickinson, Phoenix, USA) na concentração final de 12 g/L.

Suplemento:

Reagente	Concentração Final	Fabricante/País
Extrato de Levedura	50 g/L	(Beckton, Dickinson, Phoenix, USA)
Acetato de Tálcio	1 g/L	
Penicilina	1000 U/L	
NAD	5 g/L	Sigma Chemical Company, St Louis, USA
Cisteína HCl	5 g/L	
Glicose	12 g/L	
Vermelho de fenol	0,04%	
Soro Equino	40% (v/v)	Hyclone, Utah, USA
Soro Suíno	40% (v/v)	

Os soros foram inativados à 56°C por 30 minutos antes de serem misturados ao suplemento. Foram feitas soluções de NAD 1% p/v e cisteína HCl 10% p/v que foram misturadas e incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos antes de serem misturadas ao suplemento. A base, tanto do meio líquido quanto do meio sólido foi esterilizada por calor úmido. Já, o suplemento, foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm. A mistura ocorreu assepticamente, alíquotas foram retiradas para controle de pH, o qual foi ajustado para 7,8 utilizando NaOH 1M.

3.5 – Cultivo de micoplasmas e preparo de lotes semente

As cepas de *M. gallisepticum* (ATCC 15302), *M. pneumoniae* (ATCC 15492) e *M. synoviae* (CR 538631) foram cultivadas a partir de ampolas contendo pastilhas liofilizadas destes microrganismos. A hidratação foi realizada conforme descrito pelo fabricante, enquanto o *M. orale* (SEPIN Bio) foi cultivado a partir de 1mL de cultura estoque, contendo glicerol.

Depois de cultivadas em tubos e placas contendo 10mL de meio de cultura cada e observação da mudança de coloração dos meios líquidos e da formação de colônias características em meios sólidos, estas cepas de *M. gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. pneumoniae* foram diluídas seriadamente em 10mL de meios líquidos (de 10⁻¹ até 10⁻⁵) e incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO₂ de 5%.

O crescimento destes microrganismos foi acompanhado pela acidificação do meio de cultura, que evidencia a diminuição do pH pela modificação do aspecto, ou seja, a coloração muda de vermelho para amarelo gradativamente conforme a variação de pH devido à adição do vermelho de fenol. Para a construção dos lotes semente, foram utilizados os meios líquidos inoculados de uma diluição anterior à mudança da cor do meio para amarelo. As alíquotas de 1mL, dos lotes semente, foram preparadas a partir de uma mesma solução contendo 10 mL de meio inoculado, 10 mL de meio não inoculado e 20 mL de glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os lotes semente foram incubados a -20°C , até o momento do uso.

A cepa de *M. orale* foi cultivada a 37°C utilizando jarras de anaerobiose (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) e os reagentes Anaerocult (Merck, Darmstadt, Alemanha) e Anaerobic Indicator (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). Este microrganismo não metaboliza glicose, mas sim arginina, portanto, seu crescimento não pode ser evidenciado pela mudança da coloração do meio de cultura, uma vez que os produtos oriundos da degradação da arginina tendem a tornar o caldo de cultivo ainda mais alcalino. Portanto, depois da observação de colônias características em meios sólidos, esta cepa também foi diluída seriadamente (de 10^{-1} até 10^{-5}) e essas diluições plaqueadas e incubadas a 37°C em anaerobiose por 72h. A diluição 10^{-5} apresentou menor número de colônias e foi selecionada para o preparo do lote semente. As alíquotas de 1 mL, do lote semente foram preparadas a partir de uma mesma solução contendo 10 mL de meio inoculado na diluição 10^{-5} , 10mL de meio não inoculado e 20 mL de glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os lotes semente foram incubados a -20°C , até o momento do uso.

3.6 – Quantificação dos lotes semente

Para a quantificação dos lotes semente, duas alíquotas de 1mL provenientes de cada lote semente foram diluídas seriadamente (10^{-1} até 10^{-8}) em meios líquidos. Duzentos microlitros de cada uma das diluições dos meios líquidos, foram inoculadas em meios sólidos.

Concomitantemente foi transferido 1 mL de cada diluição em meios líquidos para extração de DNA. As placas foram incubadas por 7 dias e foram observadas em estereomicroscópio com aumento de 50 vezes. As contagens levaram em consideração apenas placas que continham entre 80 e 240 colônias.

3.7 – Obtenção de DNA para o PCR

Ao longo do trabalho foram utilizadas três diferentes metodologias de extração de DNA genômico.

3.7.1 – Fenol/clorofórmio

Quinze mililitros de cultura foram centrifugados à 10000 G por 30 minutos à 4°C e o precipitado foi lavado com TE (0,01M Tris-H Cl, pH8,0; 0,01 M EDTA). O precipitado foi ressuspenso em 0,5 mL de TNE (0,01 M Tris-HCl; pH 8,0; 0,01 M NaCl; 0,01 M EDTA). Foram adicionados 10µL de SDS 10%, 10 µL de sarcosina 10% e 10 µL de proteinase K 20 mg/mL (Promega, Madison, USA) e a mistura foi incubada à 50°C por 2 horas. Após incubação foram adicionados 10 µL de RNase A 10 mg/mL e foi realizada uma nova incubação, à 50°C por mais 30 minutos. Depois, foi adicionado 0,5 mL de fenol saturado. Foi realizada uma centrifugação à 13000 G por 10 minutos, seguida da transferência da fase aquosa para outro tubo onde foi adicionado 0,5 mL de uma solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1). O procedimento de adição de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, centrifugação e transferência da fase aquosa foi realizado, duas vezes. Foram adicionados 40 µL de acetato de sódio 3 M e 0,8 mL de etanol, com posterior incubação à -20°C por 16 horas. O sobrenadante após centrifugação foi desprezado. Para lavagem do precipitado, foi utilizado etanol 80%. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o DNA foi ressuspenso em água e estocado a -20°C (Bashiruddin 1998).

3.7.2 – Fervura

Um mililitro de cada amostra foi centrifugada a 13000 G por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e descartado. Foram adicionados 500 µL de uma solução de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2, contendo 0,2 mg/mL de proteinase K (Promega, Madison, USA) e a mistura foi incubada por 2 horas a 50°C. Finalmente as amostras foram centrifugadas a 13000 G por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 100 µL de PBS pH 7.2, ou seja, foi feita homogeneização do precipitado e uma nova centrifugação. Foram feitas quatro lavagens em cada amostra. Ao final da quarta lavagem o sobrenadante foi então descartado e o sedimento ressuspenso em 20 µl de PBS pH 7.2. Em seguida a amostra foi incubada a 100°C por 10 minutos e então inserida em gelo por 5 minutos, induzindo um choque térmico. Finalmente, a amostra foi centrifugada a 13000 G durante 10 minutos e o sobrenadante, contendo o DNA, foi coletado e estocado a -20°C até o momento do uso (Bashiruddin 1998).

3.7.3 – Kit comercial de Extração de DNA

A extração de DNA com o kit comercial, Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega, Madison, USA), foi realizada a partir de 1 mL de amostra, conforme as instruções do fabricante com algumas adaptações. O procedimento utilizado foi adaptado a partir da purificação de DNA genômico, descrita pelo fabricante para tecidos animais e rabo de camundongo. A incubação a 55°C por 16-18 horas foi adaptada para 3 horas apenas. As lavagens foram realizadas com apenas 500 µL de tampão de lavagem, ao invés de 650 µL e a eluição em apenas uma etapa utilizando 50 µL de água livre de DNAsas com incubação de 2 minutos.

3.8 – Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a reação de PCR, em um volume final de 25 µl, foram adicionados 250µM da mistura de dNTPs (Invitrogen, San Diego, USA), 0,6 pmoles/µL dos oligonucleotídeos iniciadores específicos sintetizados pela Invitrogen (San Diego, USA), 0,5 U da enzima AmpliTaq Gold DNA Polimerase, tampão da enzima 1X, e 2mM MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster City, USA) e 2,5 µL de DNA molde. O volume final foi completado para 25 µl com água Milli-Q.

As amplificações foram realizadas no aparelho termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Essa mistura foi aquecida por 10 min a 95°C, e ciclada 30 vezes com: 1) desnaturação a 94°C por 30s; 2) pareamento a 63°C por 30s e 3) extensão a 72°C por 90 s. Foi realizada uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR foram o iniciador senso GPO-1 (5' actcctacgggaggcagcagta 3') e o iniciador anti-senso MGSO (5' tgccacctgtcactctgttaacctc 3'). Estes dois iniciadores foram selecionados através de pesquisa na literatura científica (van Kuppeveld *et al.* 1992). Após a amplificação de DNA, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). Foi feita eletroforese à 5 v/cm² por 50 minutos. O gel foi incubado em uma solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL por 10 minutos e fotografado sob luz ultra violeta.

3.9 – Seqüenciamento dos produtos de PCR

O produto de PCR, das amostras controle dos micoplasmas, foi purificado utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA), conforme as instruções do fabricante. O produto de PCR purificado foi quantificado utilizando o padrão de peso e massa molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen, San Diego, USA). Para a reação de seqüenciamento utilizou-se a técnica de terminação de cadeia por didesoxiribonucleotídeos (ddNTPs) (Smith *et al.* 1986 e Sanger *et al.* 1977).

As reações de seqüenciamento nucleotídico foram realizadas usando o terminador BigDye versão 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, USA) diluído 1:2 em tampão Tris/Mg⁺⁺ de acordo com as instruções do fabricante.

Foram utilizados entre 20 ng e 80 ng de produto de PCR em cada reação com 3,5 pmoles de oligonucleotídeo sintético por reação, segundo recomendações do fabricante. A reação foi aquecida a 96°C por 1 minuto e submetida a 25 ciclos de: 1) desnaturação a 96°C por 10 s; 2) pareamento a 50°C por 5 s e 3) extensão a 60°C por 4 min. Em seguida, os produtos foram precipitados com 80µL de 75% isopropanol por 15 min e centrifugados por mais 15 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado uma vez com 75% etanol absoluto. Depois de seco, os precipitados foram mantidos congelados, e protegidos da luz até o uso.

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de solução de formamida, aquecidas a 95°C por 2 min para desnaturação e mantidas em gelo e protegidas da luz até o uso. A eletroforese dos produtos fluorescentes foi realizada no equipamento ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). As seqüências nucleotídicas foram analisadas usando o programa SeqMan II do pacote Lasergene versão 4.05 (DNASar). As seqüências criticadas e editadas foram alinhadas utilizando o programa MegAlign do pacote Lasergene versão 4.05 (DNASar). Foram utilizados quatro oligonucleotídeos para o seqüenciamento do produto de PCR de cada uma das cepas utilizadas, conforme tabela 3.1.

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de seqüenciamento.

<i>Oligonucleotídeo</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Tamanho</i>
Iniciador Senso: GPO-1	5' actcctacgggaggcagcagta 3'	22 pb
Iniciador Anti-Senso: MGSO	5' tgcaccatctgtcactctgttaacctc 3'	27 pb
Iniciador Senso: GPO-3	5' gggagcaaacaggattagataccct 3'	25 pb
Iniciador Anti-Senso: RLF-1	5' agggatctaatcctgtttgctccc 3'	25 pb

3.10 – Desenho do mapa de restrição e corte “in silico” com enzimas de restrição

O desenho do mapa de restrição foi realizado com auxílio de programas específicos como o pacote Lasergene versão 4.05 (DNASar) e pDRAW 32 1.0 (Alcaclone). A partir dos mapas de restrição gerados “*in silico*” foram escolhidas as enzimas para proceder a diferenciação das cepas bacterianas utilizadas. As enzimas Hinc II e Mbo I foram escolhidas devido ao padrão de restrição apresentado, ou seja, número de cortes e tamanho dos fragmentos e por apresentarem atividade enzimática com o mesmo tampão.

3.11 – Digestão dos produtos de PCR

O polimorfismo do comprimento dos fragmentos da restrição (RFLP) é uma técnica em que moléculas de DNA podem ser diferenciadas pela análise dos perfis derivados da clivagem do DNA. Este método tem por base a digestão de DNA com endonucleases de restrição e posterior separação dos fragmentos obtidos por eletroforese em gel de agarose, originando padrões de restrição.

A partir dos cromatogramas das três cepas de referência, foram selecionadas, dentre 242 enzimas, aquelas que produziam entre 1 a 3 cortes nas seqüências de interesse. Quinze microlitros dos produtos de PCR das cepas de referência *M. gallisepticum* (ATCC 15302) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492) e *M. synoviae* (CR 538631) foram incubadas com 1,0 µl (5U) de cada uma das endonucleases *Mbol* e *Hinfl* (Promega, Madison, USA) e 1 µl do tampão da enzima 10X concentrado, e incubado por 3 horas a 37°C. O material resultante foi analisado por eletroforese em gel de agarose LMP (Low Mass Fragments Promega) 3% (p/v), em TAE 1X juntamente com marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) e coloração posterior com brometo de etídio.

4 – RESULTADOS

Os resultados apresentados nesta monografia visam o estabelecimento de uma metodologia de identificação de contaminantes *Mycoplasma sp* em produtos intermediários da vacina de febre amarela, produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz. Para tanto, foram adquiridas diversas cepas de micoplasma, identificadas como possíveis agentes adventícios de produtos derivados de ovos embrionados (*Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*) e possíveis agentes adventícios de origem humana (*M. orale* e *M. pneumoniae*). Bancos de células foram estabelecidos a partir destas cepas. Além disso, foram testadas diversas metodologias de extração de DNA, bem como protocolos para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de fragmentos complementares à região do DNA que codifica para o gene 16S do RNA ribossomal (rDNA) desses microrganismos.

4.1 – Extração de DNA pela técnica de fenol/clorofórmio e amplificação de fragmentos específicos de DNA por PCR de cepas de *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. orale* (SEPIN Bio)

Com o objetivo de estabelecermos um protocolo de identificação de contaminantes de micoplasma em produtos intermediários da vacina de febre amarela avaliamos os oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO descritos por van Kuppeveld e colaboradores em 1992. Estes oligonucleotídeos reconhecem uma região conservada do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S, comum para os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. Para tanto, a partir de culturas das cepas de *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. orale* (SEPIN Bio) cedidas pela Universidade de São Paulo, cultivadas e estocadas no Setor de Processos e Insumos (SEPIN), foi realizada uma extração de DNA pelo método fenol/clorofórmio, seguida de uma reação de PCR (Figura 4.1). Obtivemos os fragmentos de tamanho esperado, conforme descrito na literatura, contendo aproximadamente 700 pares de bases (van Kuppeveld *et al.*1992). Os resultados demonstraram que os oligonucleotídeos selecionados, bem como as condições de extração e de reação de PCR poderiam ser utilizadas para o estabelecimento de uma metodologia de identificação de micoplasmas.

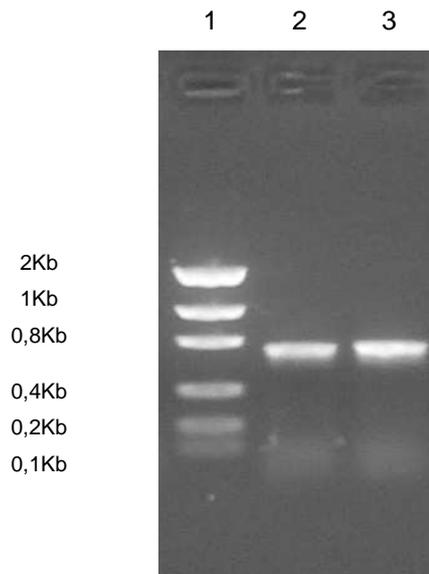


Figura 4.1 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliação da performance dos oligonucleotídeos GPO-1 e MGSO nas amostras de *M. gallisepticum* e *M. orale*. 1: marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: *M. gallisepticum*; 3: *M. orale*.

4.2 – Estabelecimento do limite de detecção da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para determinarmos o limite de detecção da metodologia de identificação de micoplasmas acima descrita, a quantidade de DNA das cepas de *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. orale* (SEPIN Bio), extraído pela técnica de fenol/clorofórmio, foi determinada por espectrofotometria. Os resultados estão descritos na tabela 4.1. Segundo Sambrook *et al.* 1989: 1 D.O. equivale a 50 µg/ml de DNA fita dupla; portanto no estoque de DNA da cepa de *M. gallisepticum* tínhamos uma concentração de 52,5 ng/µL, enquanto que no estoque de *M. orale* tínhamos uma concentração de 16,25 ng/µL.

Tabela 4.1: Quantificação do DNA extraído pela técnica de fenol/clorofórmio:

Espécie	Comprimento de onda		Concentração
	260 nm	280 nm	ng/µL
<i>M. orale</i>	0,013	0,006	0,65
<i>M. gallisepticum</i> ²	0,042	0,020	2,1

Depois da quantificação, o DNA foi diluído para aproximadamente 16 ng/ μ L de DNA para ambas as espécies e foi diluído seriadamente em escala decimal a fim de avaliar o limite de detecção do teste. Em cada tubo de reação de PCR foram adicionados 2,5 μ L de DNA de cada uma das diluições decimais seriadas (Figura 4.2). Foram evidenciados resultados positivos até a diluição 10^{-5} em ambas as espécies (*M. gallisepticum* e *M. orale*). Portanto o limite de detecção foi definido como sendo 0,4 pg de DNA em 25 μ L de reação.

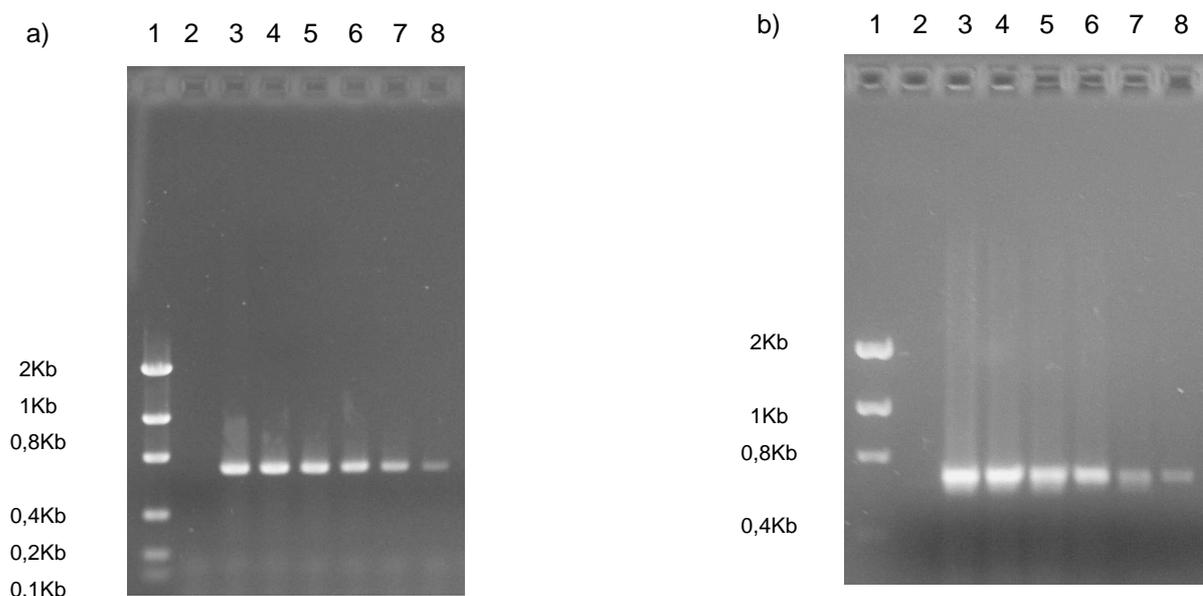


Figura 4.2 – Estabelecimento do limite de detecção da reação em cadeia da polimerase (PCR) para os DNA extraídos de *M. gallisepticum* (painel A) e *M. orale* (painel B). 1: Marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle negativo da reação de PCR; 3: 40 ng de DNA; 4: 4 ng de DNA; 5: 0,4 ng de DNA; 6: 0,04 ng de DNA; 7: 0,004 ng de DNA e 8: 0,0004 ng de DNA.

4.3 – Extração de DNA por fervura

Para otimizarmos o método de extração de DNA de maneira a obter uma maior agilidade do processo, foi testada uma extração de DNA por fervura, que além de não gerar resíduos químicos perigosos é mais rápida em relação a anterior (Figura 4.3).

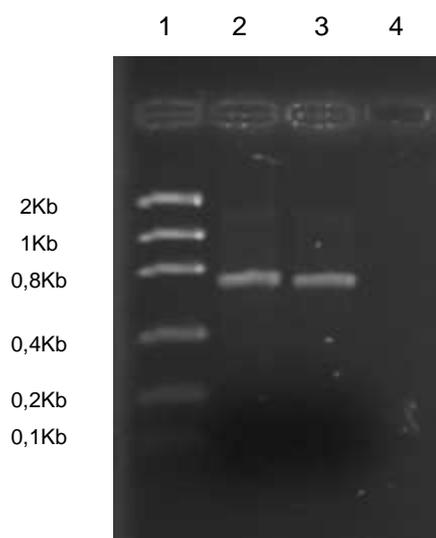


Figura 4.3: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliação do método de extração de DNA por fervura. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: *M. gallisepticum*; 3: *M. orale* e 4: Controle negativo de PCR.

4.4 – Determinação da especificidade da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para evidenciarmos a especificidade da metodologia até agora estabelecida, foram utilizadas cepas de bactérias não pertencentes ao gênero *Mollicutes*. A partir de estoques de microrganismos quantificados pelo SEPIN, utilizados regularmente em testes de promoção de crescimento de meios de cultura, foi realizada extração de DNA por fervura, seguida de PCR utilizando os oligonucleotídeos MGSO e GPO-1. Os microrganismos utilizados foram: *Clostridium sporogenes*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* em duas diluições distintas (Figura 4.4). Não foi evidenciado nenhum produto de amplificação utilizando o DNA das bactérias testadas, indicando assim, uma não interferência do DNA destes microrganismos para a metodologia empregada.

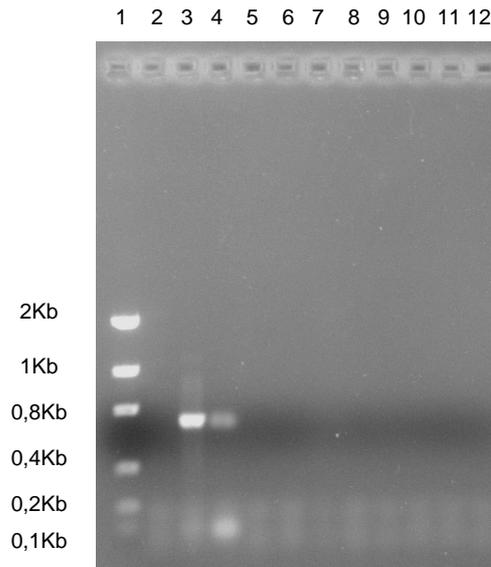


Figura 4.4: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para verificação da especificidade da metodologia estabelecida utilizando DNA proveniente de cepas bacterianas não pertencentes ao gênero *Mollicutes*. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle negativo de PCR; 3: Controle positivo de extração; 4: Controle positivo de PCR; 5: *Micrococcus luteus* 54 (UFC/mL); 6: *Clostridium sporogenes* (62 UFC/mL); 7: *Staphylococcus aureus* (68 UFC/mL); 8: *Bacillus subtilis* (50 UFC/mL); 9: *Micrococcus luteus* (540 UFC/mL); 10: *Clostridium sporogenes* (620 UFC/mL); 11: *Staphylococcus aureus* (680 UFC/mL) e 12: *Bacillus subtilis* (500 UFC/mL).

4.5 – Desafio da metodologia frente aos produtos intermediários da vacina de febre amarela

A fim de avaliarmos a adequação da metodologia aos produtos intermediários da vacina, foi realizado um PCR, utilizando o DNA extraído por fervura, de três lotes de suspensão viral e três lotes de produto acabado a granel (PAG) puros, ou seja, sem adição de micoplasmas, assim como três lotes dos mesmos produtos intermediários intencionalmente contaminados com aproximadamente 70 UFC, tanto de *M. gallisepticum* como de *M. orale* (figura 4.5). As quantificações dos micoplasmas foram realizadas com base em resultados dos testes de promoção de crescimento para meios de cultura PPLO realizados pelo SEPIN a partir de estoques de micoplasmas congelados com glicerol.

Podemos observar que o PCR foi capaz de detectar micoplasmas, a partir do DNA extraído de amostras de suspensão viral e PAG intencionalmente contaminados. O Não foram observadas ampliações de bandas inespecíficas nas amostras de suspensão viral e PAG livres de micoplasma.

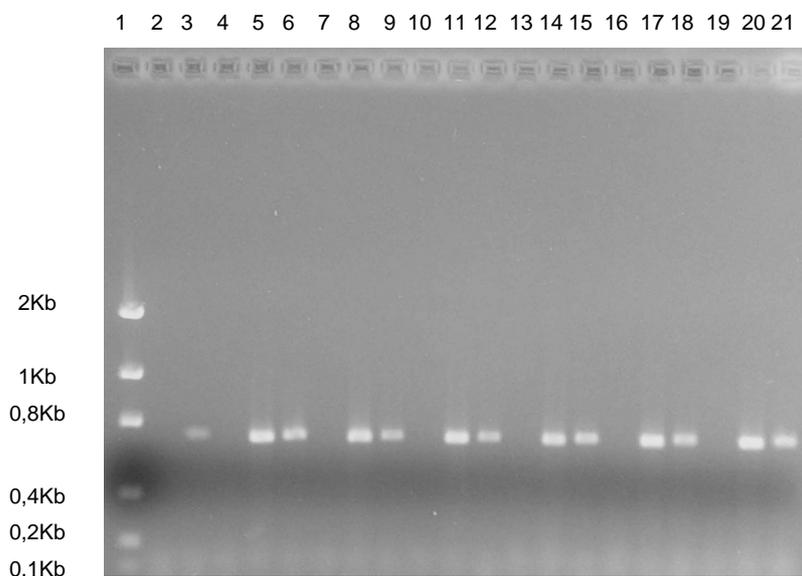


Figura 4.5: Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando DNA extraído dos produtos intermediários da vacina de febre amarela contaminados ou não com micoplasma. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: Controle Positivo de PCR; 4: PAG 054VFA035Z; 5: PAG 054VFA035Z com *M. gallisepticum*; 6: PAG 054VFA035Z com *M. orale*; 7: PAG 054VFA036Z; 8: PAG 054VFA036Z com *M. gallisepticum*; 9: PAG 054VFA036Z com *M. orale*; 10: PAG 054VFA037Z; 11: PAG 054VFA037Z com *M. gallisepticum*; 12: PAG 054VFA037Z com *M. orale*; 13: Suspensão 05FCE028; 14: Suspensão 05FCE028 com *M. gallisepticum*; 15: Suspensão 05FCE028 com *M. orale*; 16: Suspensão 05FCE029; 17: Suspensão 05FCE029 com *M. gallisepticum*; 18: Suspensão 05FCE029 com *M. orale*; 19: Suspensão 05FCE030; 20: Suspensão 05FCE030 com *M. gallisepticum* e 21: Suspensão 05FCE030 com *M. orale*

4.6 – Elaboração do Procedimento Operacional Padronizado (POP)

Os resultados, obtidos até este momento, indicavam que a metodologia empregada, tendo como controles positivos as cepas de *M. gallisepticum* e *M. orale* cedidas pela Universidade de São Paulo e estocadas no Setor de Processos e Insumos (SEPIN), estava adequada a ser utilizada pelo controle de qualidade.

Foi elaborado um procedimento operacional padronizado (POP) da metodologia de extração de DNA por fervura, seguida de PCR para detecção de micoplasmas em produtos intermediários da Vacina contra Febre Amarela. Este protocolo foi registrado pelo Controle e Garantia da Qualidade de Bio-Manguinhos/Fiocruz sob o número 102210.562, conforme Anexo I.

4.7 – Amostras testadas em 2005 e 2006

Com o objetivo de demonstrarmos a reprodutibilidade da metodologia estabelecida até o momento, amostras de todos os lotes de produto acabado a granel (PAG) e de pool de suspensão viral da vacina contra febre amarela produzidas em 2005 e 2006 foram testadas, conforme o procedimento operacional padronizado nº 102210.562. Da mesma forma, algumas amostras de inóculo de vírus vacinal (utilizado para produção da vacina), soros de animais (utilizados como insumos na produção dos meios PPLO), amostras de pool de suspensão viral produzidas em 2003 e 2004 assim como determinados frascos individuais utilizados para produzir PAG em 2005 também foram testadas, perfazendo um total de 615 testes, conforme a tabela 2. Em cada análise foram inseridos dois controles positivos e um controle negativo. Os controles positivos foram: um controle de extração de DNA, ou seja, uma cultura pura de *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) não quantificada e um controle de PCR, ou seja, DNA de *M. orale* (SEPIN Bio) extraído quantificado (0,004 ng de DNA). Esta metodologia foi empregada conforme o procedimento operacional padronizado de número 102210.562.

Tabela 4.2 – Amostras de produtos intermediários testados entre os anos de 2005 e 2006:

Nº de Lotes	Tipo de Produto Intermediário
147	Produto Acabado a Granel 2005
106	Frascos Individuais Suspensão Viral 2005
78	Pool de Suspensão Viral 2005
29	Frascos Individuais de Suspensão Viral 2004
43	Pool de Suspensão Viral 2004
3	Pool de Suspensão Viral 2003
20	Inóculo de Vírus Vacinal
131	Produto Acabado a Granel 2006
1	Produto Acabado a Granel Experimental 2004
3	Produto Acabado a Granel Experimental (10 Doses)
50	Pool de Suspensão Viral 2006
4	Lotes de Soros Animais

Todas as suspensões virais, assim como os produtos acabados (PAG), citados na tabela 4.2, foram testados também pelo Setor de Esterilidade (SEEST) pelo método direto, utilizando meios de cultura apropriados. Os resultados de ambas as metodologias demonstraram concordância nos resultados, ou seja, ausência de micoplasmas. Na figura 4.6, observamos uma das reações de PCR realizadas para testar os produtos intermediários da vacina contra febre amarela nos anos de 2005 e 2006.

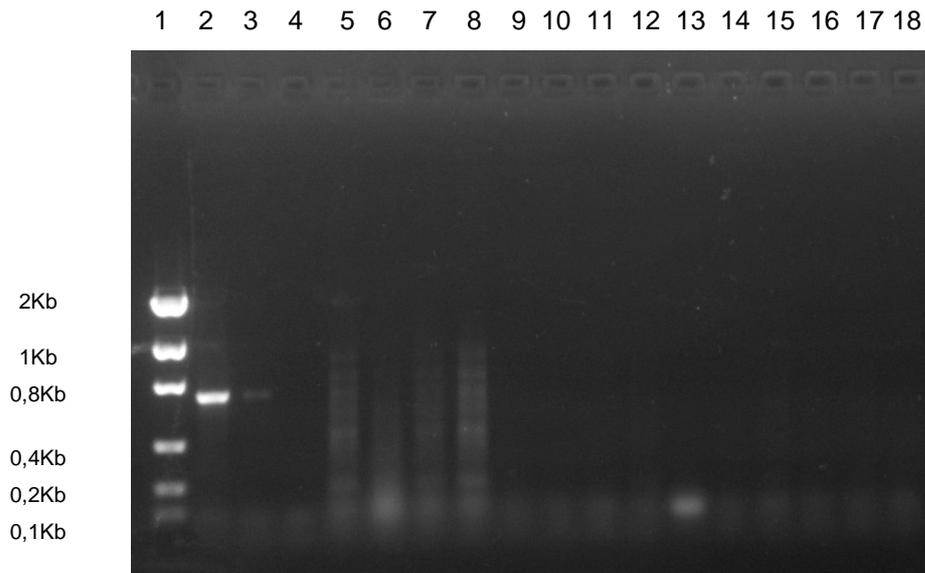


Figura 4.6: Exemplo de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando DNA extraído dos produtos intermediários da vacina de febre amarela testados nos anos de 2005 e 2006. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle positivo de extração; 3: Controle positivo de PCR; 4: Controle Negativo; 5: 05FCE028; 6: 05FCE029; 7: 05FCE030; 8: 05FCE031; 9: 056VFA067Z; 10: 056VFA068Z; 11: 056VFA069Z; 12: 056VFA070Z; 13: 056VFA071Z; 14: 056VFA072Z; 15: 056VFA073Z; 16: 056VFA074Z; 17: 056VFA075Z e 18: 056VFA076Z

4.8 – Produção e quantificação de bancos de cepas de micoplasmas

Com objetivo de adquirir um maior grau de certificação da metodologia empregada foram adquiridas as cepas bacterianas de referência: *M. gallisepticum* (ATCC 15302), *M. pneumoniae* (ATCC 15492) e *M. synoviae* (CR 538631). Estas cepas de referência, assim como a cepa de *M. orale* (SEPIN Bio) foram cultivadas em um único meio de cultura, o meio PPLO produzido no Setor de Meios de Cultura (SEMEC) de Bio-Manguinhos/Fiocruz e foi evidenciado o crescimento característico destes quatro microrganismos em meios sólidos, ou seja, colônias em forma de “ovo frito” (Figura 4.7).

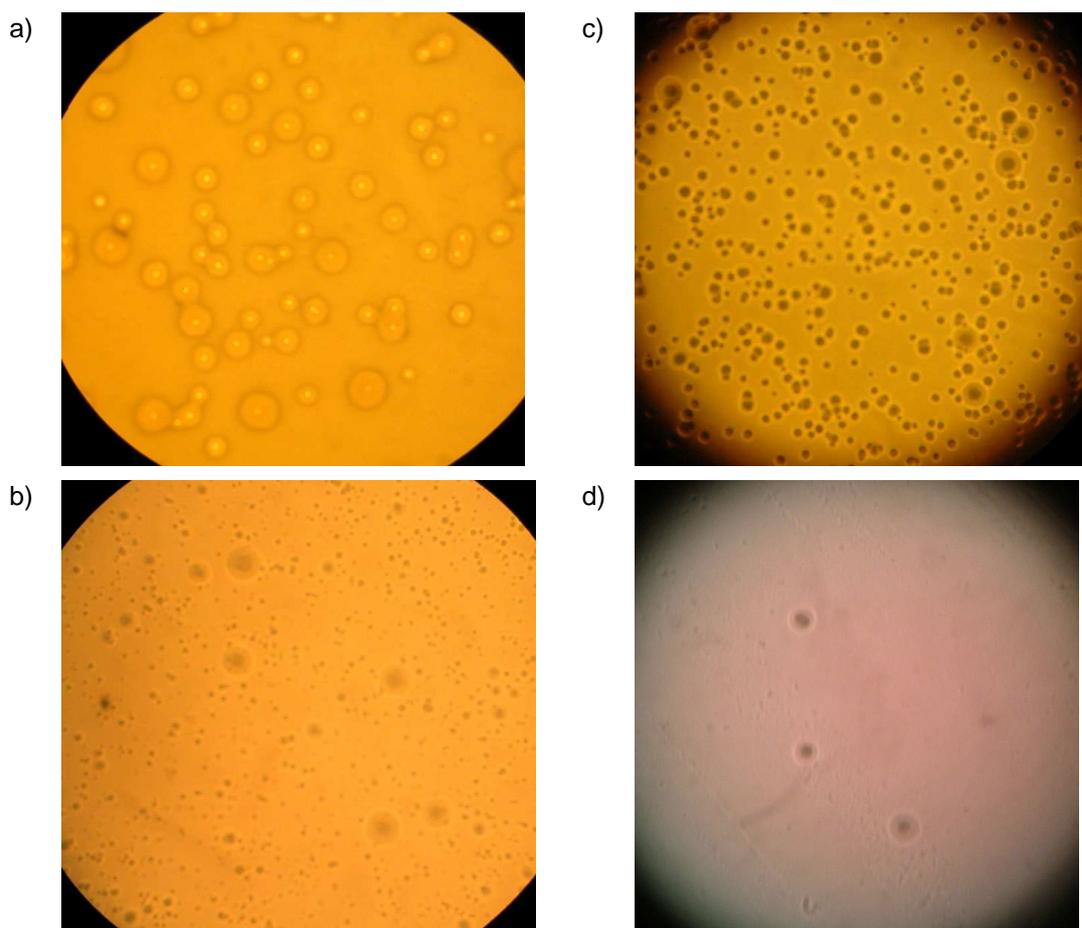


Figura 4.7: Fotografias de culturas de micoplasmas em placas de *Petri* contendo meio sólido (agar PLO) com, aumento de 100X. A: *M. gallisepticum*, B: *M. orale*, C: *M. synoviae* e D: *M. pneumoniae*.

Foram preparados bancos de células das quatro cepas de micoplasmas para estabelecer os limites de detecção da metodologia em unidades formadoras de colônias, de maneira que a sensibilidade da metodologia de detecção de micoplasmas por PCR pudesse ser comparada com os resultados obtidos utilizando o método direto. O banco de micoplasmas preparado para cada uma das cepas gerou aproximadamente 30 tubos com 1ml cada. Os resultados da quantificação pelo método direto foram realizados em duplicata para cada uma das espécies de micoplasmas e a média dos resultados pode ser observada na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Quantificação dos bancos de cepas de micoplasmas:

Espécie	UFC/mL
<i>M. gallisepticum</i>	43,6x10 ⁵
<i>M. orale</i>	51,1x10 ⁵
<i>M. synoviae</i>	49,2x10 ⁵
<i>M. pneumoniae</i>	11,7 x10 ³

4.9 – Amplificação por PCR das cepas *M. gallisepticum* (ATCC 15302), *M. pneumoniae* (ATCC 15492), *M. synoviae* (CR 538631) e *M. orale* (SEPIN Bio)

Adotamos um novo procedimento para extração de DNA, utilizando o kit Wizard SV Genomic DNA Purification System, de maneira que a metodologia de extração continuasse com a agilidade necessária para atender a rotina de análise dos produtos intermediários da produção da vacina de febre amarela, mas que apresentasse também uma reprodutibilidade garantida e um maior grau de pureza para o DNA extraído.

Com a finalidade de evidenciar a amplificação do fragmento de DNA das cepas de micoplasmas, oriundas dos bancos celulares, foi realizado um PCR a partir do DNA extraído a partir de um tubo proveniente de cada um dos bancos de cepas de micoplasmas para cada espécie (Figura 4.8). Não foi evidenciada a amplificação de nenhum produto de PCR para a cepa de *M. gallisepticum* ATCC 15302. Porém os outros micoplasmas apresentaram o resultado esperado. Devido ao resultado obtido no PCR para a cepa de *M. gallisepticum* do ATCC, foram testadas novas condições para o ciclo de amplificação de PCR, com modificações na temperatura de anelamento. Foram testadas três temperaturas de anelamento diferentes: 55, 59 e 63°C. Observamos na figura 4.9 que apenas na temperatura de 55°C obtivemos um produto de amplificação de *M. gallisepticum* (ATCC 15302).

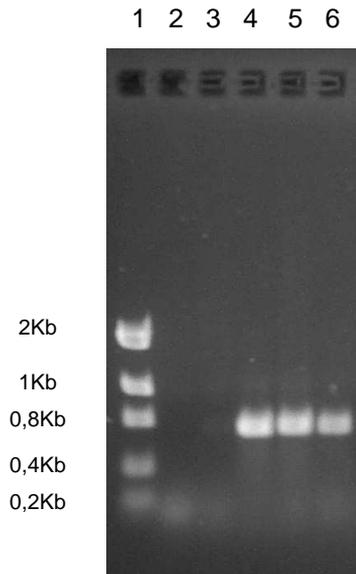


Figura 4.8: Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando DNA extraído a partir de tubos provenientes do banco de cepas de micoplasmas. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: *M. gallisepticum*; 4: *M. orale*; 5: *M. synoviae*; 6: *M. pneumoniae*.

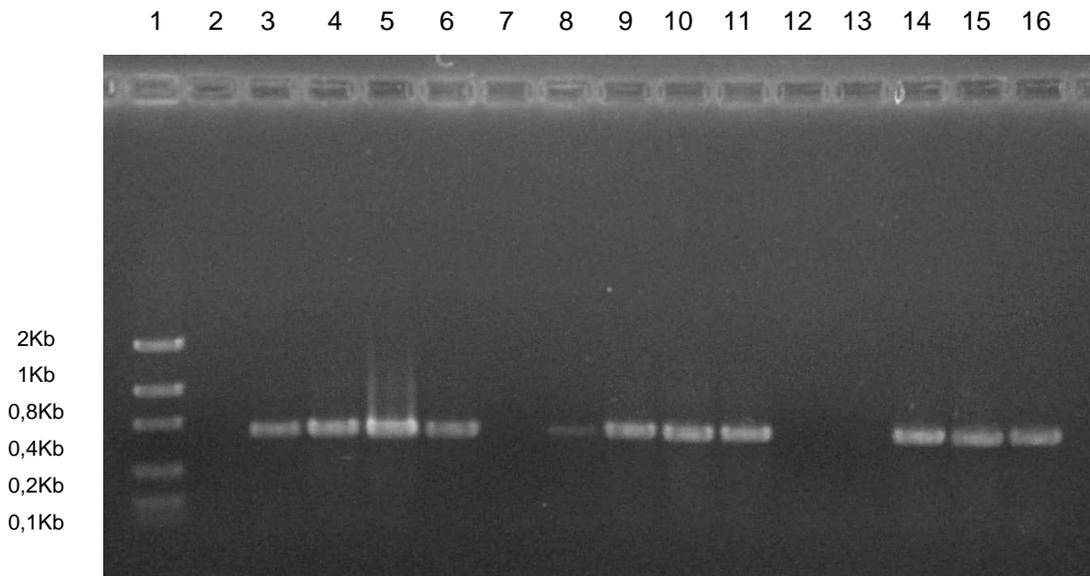


Figura 4.9: Reação em cadeia da polimerase (PCR) com modificações na temperatura de anelamento. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR (55°C); 3: *M. gallisepticum* (55°C); 4: *M. orale* (55°C); 5: *M. synoviae* (55°C); 6: *M. pneumoniae* (55°C); 7: Controle Negativo de PCR (59°C); 8: *M. gallisepticum* (59°C); 9: *M. orale* (59°C); 10: *M. synoviae* (59°C); 11: *M. pneumoniae* (59°C); 12: Controle Negativo de PCR (63°C); 13: *M. gallisepticum* (63°C); 14: *M. orale* (63°C); 15: *M. synoviae* (63°C); 16: *M. pneumoniae* (63°C).

4.10 – Avaliação da especificidade dos oligonucleotídeos utilizando baixa temperatura de anelamento

Para evidenciar a especificidade dos oligonucleotídeos nas reações de PCR utilizando baixa temperatura de anelamento (55°C), testamos amostras das quatro cepas de micoplasmas, microrganismos não pertencentes ao gênero *Mollicutes* a partir de estoques de microrganismos de referência do SEPIN, quantificados e utilizados regularmente em testes de promoção de crescimento de meios de cultura, assim como três lotes distintos de produtos intermediários da vacina (Figura 4.10). Utilizando a temperatura de anelamento de 55°C na reação de PCR foi evidenciada a amplificação inespecífica de produtos de PCR nos produtos intermediários. Este experimento foi realizado uma segunda vez com uma temperatura de anelamento de 63°C, para assegurar que a inespecificidade, da reação frente aos produtos intermediários, ocorria apenas se a temperatura de anelamento fosse de 55°C (Figura 4.11). Portanto, demonstramos a ausência de produtos de PCR inespecíficos nos produtos intermediários, assim como no *M. gallisepticum* ATCC 15302 quando a temperatura de anelamento de 63°C foi utilizada.

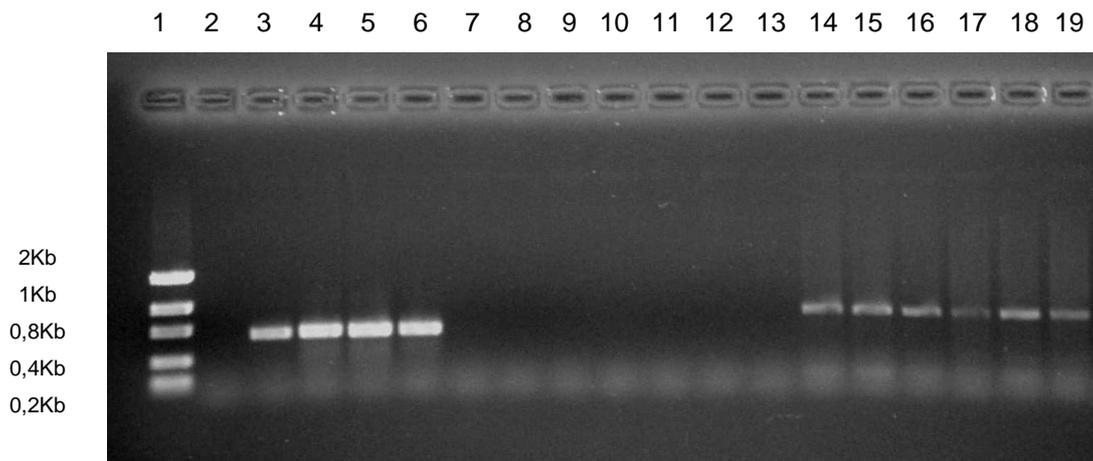


Figura 4.10: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos utilizando baixa temperatura de anelamento (55°C). 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: *M. gallisepticum*; 4: *M. orale*; 5: *M. synoviae*; 6: *M. pneumoniae*; 7: *Bacillus subtilis*; 8: *Candida albicans*; 9: *Clostridium sporogenes*; 10: *Escherichia coli*; 11: *Micrococcus luteus*; 12: *Pseudomonas aeruginosa*; 13: *Staphylococcus aureus*; 14: 06OVFA104Z A; 15: 06OVFA107Z; 16: 071VFA005Z; 17: 05FCE043; 18: 05FCE044; 19: 05FCE049.

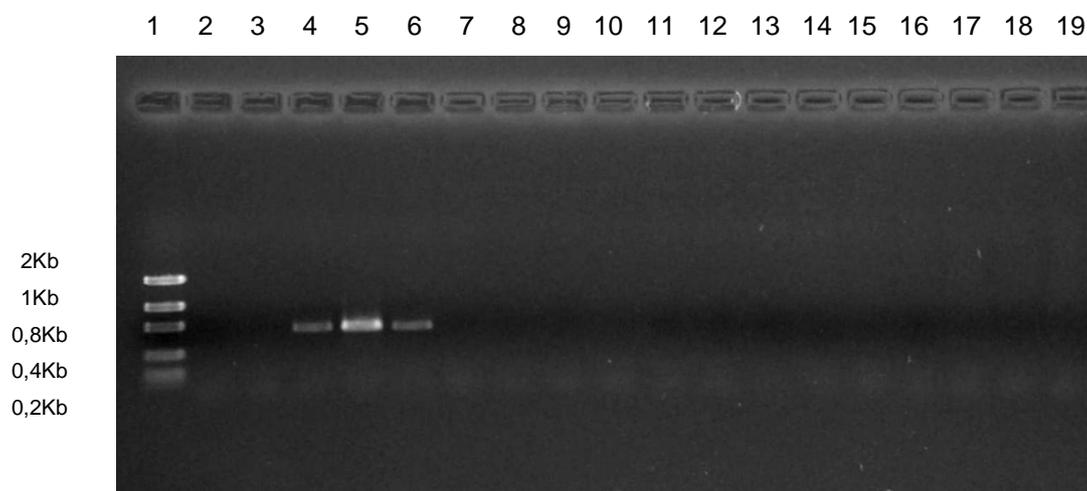


Figura 4.11: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliar a especificidade dos oligonucleotídeos utilizando a temperatura de anelamento de 63°C. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: *M. gallisepticum*; 4: *M. orale*; 5: *M. synoviae*; 6: *M. pneumoniae*; 7: *Bacillus subtilis*; 8: *Candida albicans*; 9: *Clostridium sporogenes*; 10: *Escherichia coli*; 11: *Micrococcus luteus*; 12: *Pseudomonas aeruginosa*; 13: *Staphylococcus aureus*; 14: 06OVFA104Z A; 15: 06OVFA107Z; 16: 071VFA005Z; 17: 05FCE043; 18: 05FCE044; 19: 05FCE049.

4.11 – Determinação do limite de detecção da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de culturas de micoplasma quantificadas

Com o objetivo de estabelecer o limite de detecção da metodologia, em unidades formadoras de colônias, de maneira que a sensibilidade da metodologia de detecção de micoplasmas por PCR pudesse ser comparada com os resultados obtidos utilizando métodos de cultivo em meios sólidos, foram utilizadas diluições decimais seriadas a partir dos tubos dos bancos celulares de micoplasmas. Duas réplicas de cada espécie foram utilizadas para diminuir a possibilidade de variação. Para a cepa de *M. gallisepticum* ATCC 15302, a reação de PCR proposta, utilizando uma temperatura de 63°C não evidenciou a formação de produtos de PCR (Figura 4.12). Já a reação para esta cepa utilizando uma temperatura de 55°C evidenciou a formação de produtos de PCR apenas nas maiores concentrações, ou seja $43,6 \times 10^4$ UFC/mL e $43,6 \times 10^3$ UFC/mL (Figura 4.13). Portanto a cepa de *M. gallisepticum* ATCC 15302 foi excluída de nossas análises, no aspecto quantitativo. Para as cepas de *M. orale* (SEPIN Bio) e *M. synoviae* (CR 538631) o limite de detecção determinado, pela diluição no meio de cultura PPLO líquido, foi de aproximadamente 50 UFC/mL (Figuras 4.14 e 4.15). Já, para a cepas de *M. pneumoniae* (ATCC 15492) o limite de detecção determinado, em caldo PPLO, foi de aproximadamente 10 UFC/mL (Figura 4.16).

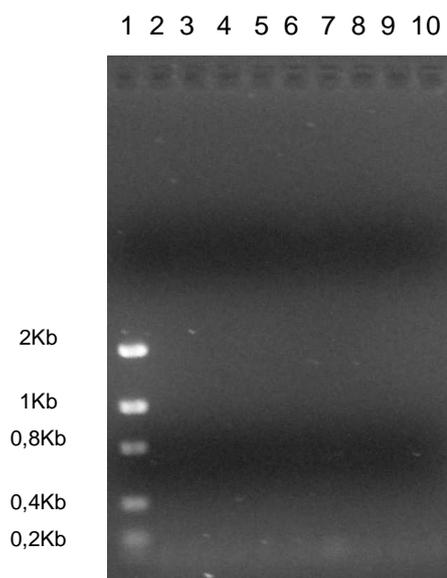


Figura 4.12: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. gallisepticum* em caldo PPLO, utilizando uma temperatura de anelamento de 63°C. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^4$ UFC/mL; 4: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^3$ UFC/mL; 5: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^2$ UFC/mL; 6: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^1$ UFC/mL; 7: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^0$ UFC/mL; 8: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^{-1}$ UFC/mL; 9: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^{-2}$ UFC/mL e 10: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^{-3}$ UFC/mL.

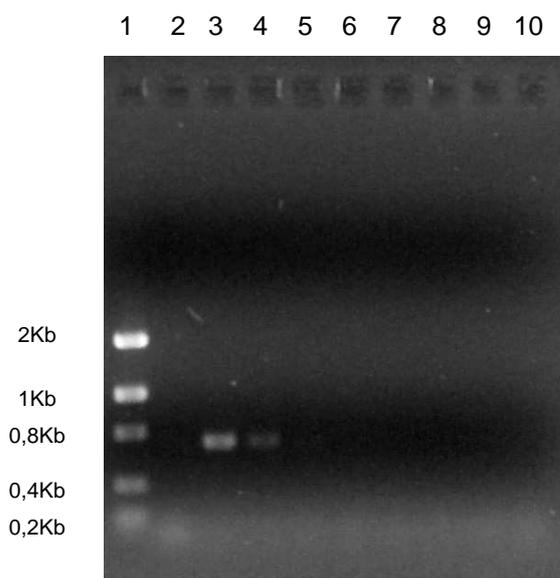


Figura 4.13: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. gallisepticum* em caldo PPLO, utilizando uma temperatura de anelamento de 55°C. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^4$ UFC/mL; 4: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^3$ UFC/mL; 5: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^2$ UFC/mL; 6: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^1$ UFC/mL; 7: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^0$ UFC/mL; 8: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^{-1}$ UFC/mL; 9: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^{-2}$ UFC/mL e 10: Caldo PPLO com $43,6 \times 10^{-3}$ UFC/mL.

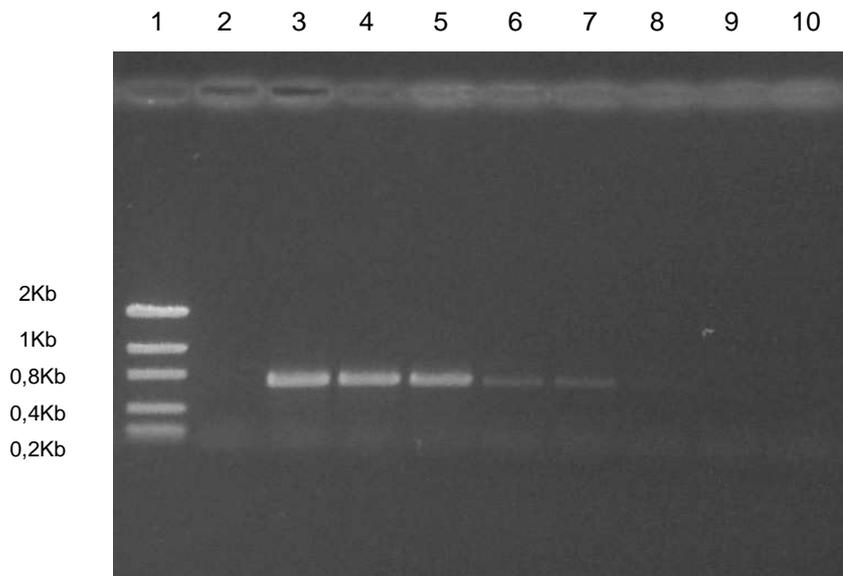


Figura 4.14: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. orale* em caldo PPLO. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: Caldo PPLO com $51,1 \times 10^4$ UFC/mL; 4: Caldo PPLO com $51,1 \times 10^3$ UFC/mL; 5: Caldo PPLO com $51,1 \times 10^2$ UFC/mL; 6: Caldo PPLO com $51,1 \times 10^1$ UFC/mL; 7: Caldo PPLO com $51,1 \times 10^0$ UFC/mL; 8: Caldo PPLO com $51,1 \times 10^{-1}$ UFC/mL; 9: Caldo PPLO com $51,1 \times 10^{-2}$ UFC/mL e 10: Caldo PPLO com $51,1 \times 10^{-3}$ UFC/mL.

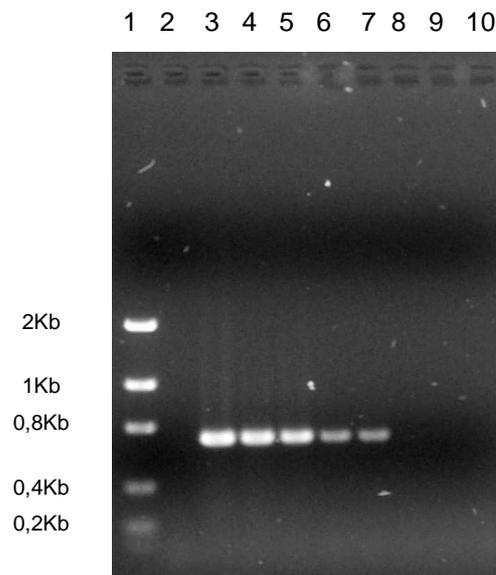


Figura 4.15: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. synoviae* em caldo PPLO. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: Caldo PPLO com $49,2 \times 10^4$ UFC/mL; 4: Caldo PPLO com $49,2 \times 10^3$ UFC/mL; 5: Caldo PPLO com $49,2 \times 10^2$ UFC/mL; 6: Caldo PPLO com $49,2 \times 10^1$ UFC/mL; 7: Caldo PPLO com $49,2 \times 10^0$ UFC/mL e 8: Caldo PPLO com $49,2 \times 10^{-1}$ UFC/mL; 9: Caldo PPLO com $49,2 \times 10^{-2}$ UFC/mL e 10: Caldo PPLO com $49,2 \times 10^{-3}$ UFC/mL.

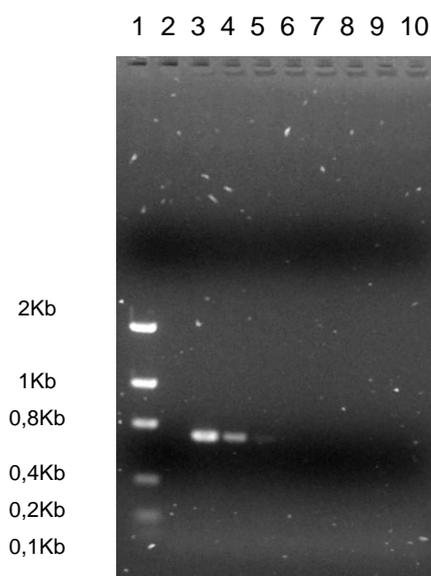


Figura 4.16: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. pneumoniae* em caldo PPLO. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Controle Negativo de PCR; 3: Caldo PPLO com $11,7 \times 10^2$ UFC/mL; 4: Caldo PPLO com $11,7 \times 10^1$ UFC/mL; 5: Caldo PPLO com $11,7 \times 10^0$ UFC/mL; 6: Caldo PPLO com $11,7 \times 10^{-1}$ UFC/mL; 7: Caldo PPLO com $11,7 \times 10^{-2}$ UFC/mL; 8: Caldo PPLO com $11,7 \times 10^{-3}$ UFC/mL; 9: Caldo PPLO com $11,7 \times 10^{-4}$ UFC/mL e 10: Caldo PPLO com $11,7 \times 10^{-5}$ UFC/mL.

4.12 – Seqüenciamento dos produtos de PCR

Com o objetivo de estabelecer um protocolo de RFLP (polimorfismo do comprimento dos fragmentos da restrição) para distinguir as diferentes espécies de micoplasmas, assim como para efetuar um controle de qualidade dos bancos de micoplasmas foram seqüenciados os produtos de PCR, gerados com os oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO e com a temperatura de anelamento de 55°C.

Foram seqüenciados os fragmentos das cinco cepas de micoplasmas utilizadas no presente estudo, ou seja, *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. orale* (SEPIN BIO), *M. gallisepticum* ATCC 15302, *M. synoviae* (CR 538631) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492).

Os cromatogramas provenientes do seqüenciamento foram visualizados e editados pelo SeqMan II do pacote Lasergene versão 4.05 (DNASar). Os seqüenciamentos dos produtos de PCR foram comparados com seqüências depositadas em bancos de dados disponíveis no GenBank (National Center for Biotechnology Information 2007). Utilizando os programas EditSeq e MegAlign do pacote Lasergene versão 4.05 (DNASar) foram realizados alinhamentos entre os micoplasmas utilizados no presente estudo assim como outras seqüências de micoplasmas depositadas no GenBank. A partir destas seqüências foi construída uma árvore filogenética, conforme figura 4.17. O resultado da análise filogenética demonstrou que a cepa de *M. orale* (SEPIN Bio), utilizada neste trabalho, está inserida no mesmo ramo que a seqüência de *M. iowae* (AM073012).

Foi realizada uma análise utilizando o programa Blast (National Center for Biotechnology Information 2007) para verificarmos o grau de identidade das cepas utilizadas neste trabalho com seqüências depositadas no GenBank. A seqüência de 714 pb, referente à cepa de *M. orale* (SEPIN Bio), apresentou 99% de homologia com *M. iowae* (AM073012) e 79% com *M. orale* (AY796060). Portanto esta cepa foi excluída de nossas análises. Já as seqüências de *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. gallisepticum* ATCC 15302 apresentaram homologia de 100% das 714 pb.

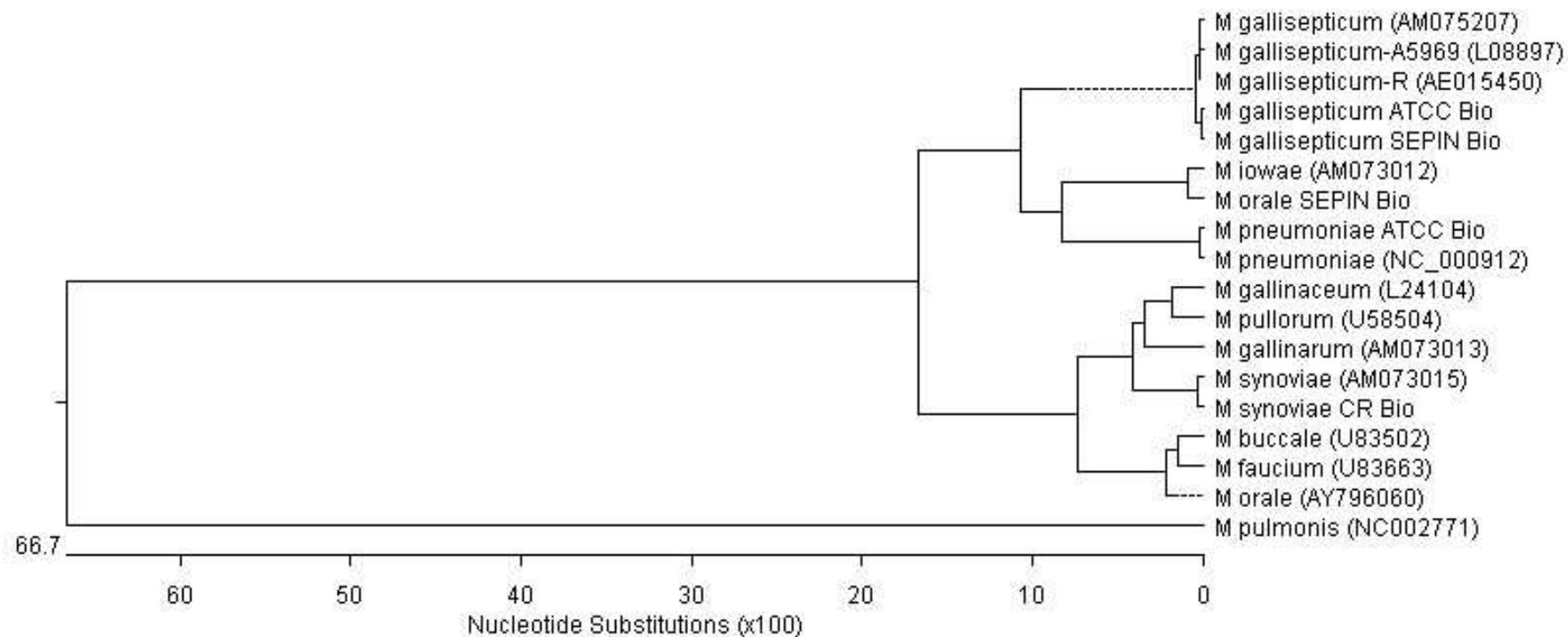


Figura 4.17: Análise filogenética dos fragmentos do rDNA 16S das cepas *M. gallisepticum* e *M. orale* (SEPIN Bio), *M. gallisepticum* ATCC 15302, *M. synoviae* (CR 538631) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492) e outras seqüências de micoplasmas depositadas no GenBank.

4.13 – Avaliação da performance de amplificação por PCR da cepa *M. gallisepticum* (ATCC 15302) com os oligonucleotídeos utilizados na reação de seqüenciamento

Com o intuito de melhorar a eficiência de detecção da cepa *M. gallisepticum* (ATCC 15302), testamos em uma reação de PCR, além dos oligonucleotídeos GPO-1 e MGSO, os oligonucleotídeos internos ao produto de 714 pb, utilizados no seqüenciamento (RLF-1 e GPO-3). Além disso, testamos duas diferentes temperaturas de anelamento (63 e 55°C) e a cepa de *M. pneumoniae* (ATCC 15492) foi utilizada como controle positivo da reação (figura 4.18). Foram utilizados três pares de oligonucleotídeos iniciadores: GPO-1 com MGSO, GPO-3 com MGSO e GPO-1 com RLF-1 sendo que os tamanhos aproximados dos produtos de PCR são 700 pb, 300 pb e 400 pb, respectivamente. Para cepa de *M. gallisepticum* (ATCC 15302), com a temperatura de 55°C, foram evidenciados os produtos de PCR com todos os pares de oligonucleotídeos iniciadores testados, já com a temperatura de anelamento de 63°C não foram evidenciados produtos de PCR quando o oligonucleotídeo iniciador MGSO foi utilizado.

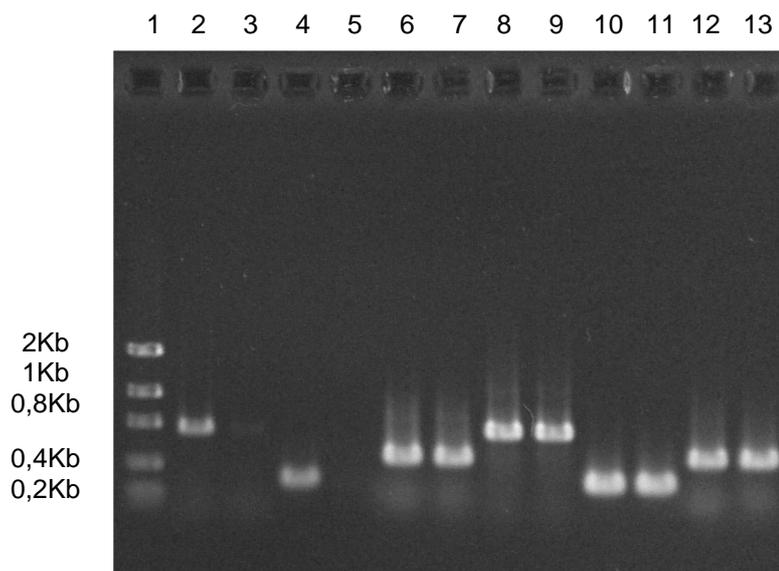


Figura 4.18 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliação da performance dos oligonucleotídeos GPO-1 com MGSO, GPO-3 com MGSO e GPO-1 com RLF-1 utilizando duas temperaturas de anelamento (55 e 63°C) nas amostras de *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae*. 1: marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: *M. gallisepticum* 55°C – GPO-1 com MGSO; 3: *M. gallisepticum* 63°C – GPO-1 com MGSO; 4: *M. gallisepticum* 55°C – GPO-3 com MGSO; 5: *M. gallisepticum* 63°C – GPO-3 com MGSO; 6: *M. gallisepticum* 55°C – GPO-1 com RLF-1; 7: *M. gallisepticum* 63°C – GPO-1 com RLF-1; 8: *M. pneumoniae* 55°C – GPO-1 com MGSO; 9: *M. pneumoniae* 63°C – GPO-1 com MGSO; 10: *M. pneumoniae* 55°C – GPO-3 com MGSO; 11: *M. pneumoniae* 63°C – GPO-3 com MGSO; 12: *M. pneumoniae* 55°C – GPO-1 com RLF-1 e 13: *M. pneumoniae* 63°C – GPO-1 com RLF-1.

4.14 – Desenho dos mapas de restrição dos produtos de PCR *in silico*

Com o objetivo de distinguir os produtos de PCR das cepas *M. gallisepticum* ATCC 15302, *M. synoviae* (CR 538631) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492) foi realizada uma simulação *in silico*, dos perfis de corte por enzimas de restrição distintas para cada um dos fragmentos seqüenciados, com o auxílio do programa DNASTar da LaserGene. SeqMan II do pacote Lasergene versão 4.05 (DNASTar).

A partir das seqüências obtidas das cepas *M. gallisepticum* ATCC 15302, *M. synoviae* (CR 538631) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492), foram selecionadas, enzimas de restrição que produziam entre 1 e 3 cortes nas seqüências de interesse. Foram selecionadas as enzimas *Mbol* (um isoesquisômero da *Sau3AI*) e *Hinfl* (Invitrogen) para tipagem dos micoplasmas (Figuras 4.19, 4.20 e 4.21).

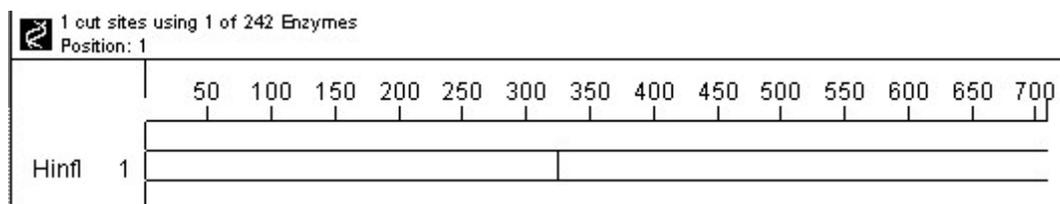


Figura 4.19 – Pontos de corte do produto de PCR de *M. gallisepticum* utilizando apenas a enzima de restrição *HinfI*, uma vez que esta seqüência não possui sítios para *Mbol*.

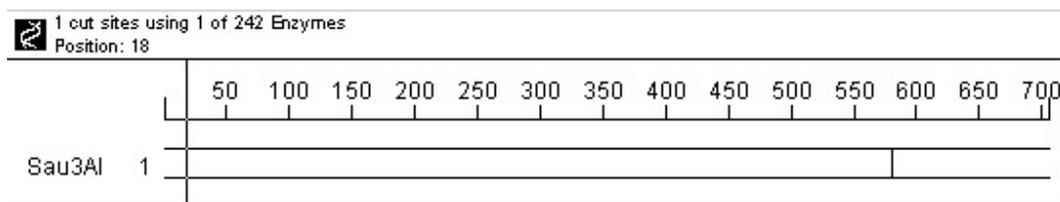


Figura 4.20 – Pontos de corte do produto de PCR de *M. synoviae* utilizando apenas a enzima de restrição *Sau3AI* (isoesquisômero da *Mbol*, uma vez que esta seqüência não possui sítios para *Hinf I*.

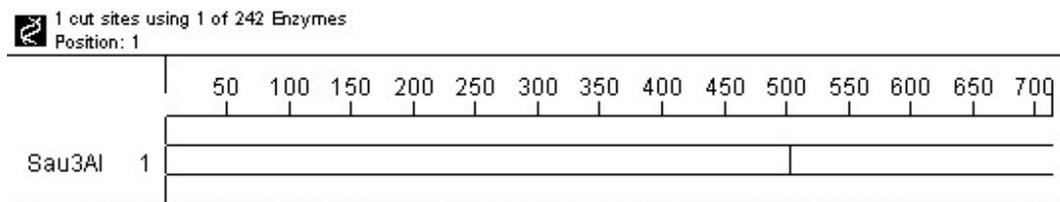


Figura 4.21 – Pontos de corte do produto de PCR de *M. pneumoniae* utilizando apenas a enzima de restrição *Sau3AI* (isoesquisômero da *Mbol*, uma vez que esta seqüência não possui sítios para *Hinf I*.

Com a finalidade de observar o perfil de corte dos fragmentos de cada uma das digestões, foi realizado um ensaio “*in silico*” da eletroforese em gel de agarose (3%) do produto da dupla digestão por *Mbol* e *HinfI* utilizando o programa pDRAW 32 1.0 da Alcaclone que demonstrou que estas enzimas teriam grande poder discriminatório, pois seriam capazes de diferenciar facilmente as cepas de *M. gallisepticum*, *M. synoviae* e *M. pneumoniae* gerando perfis de polimorfismo distintos (Figuras 4.22, 4.23 e 4.24).

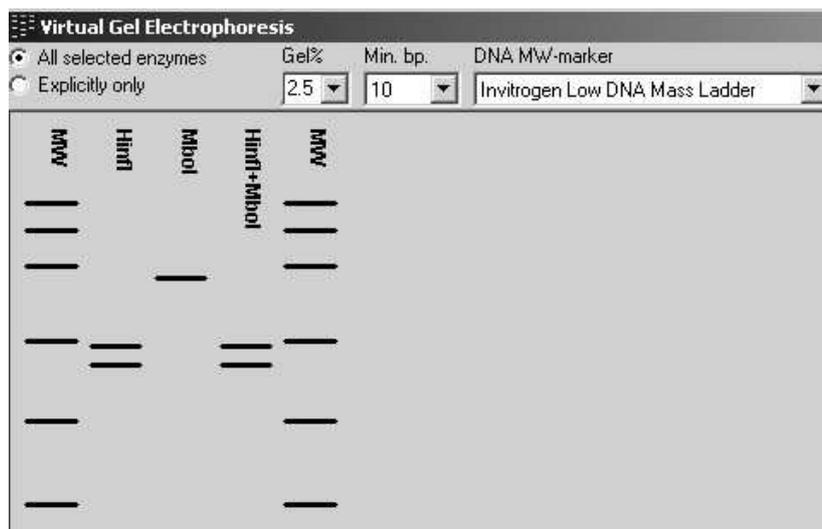


Figura 4.22 - Simulação da eletroforese da dupla digestão do produto de PCR de *M. gallisepticum* utilizando as enzimas *HinfI* e *Mbol*.

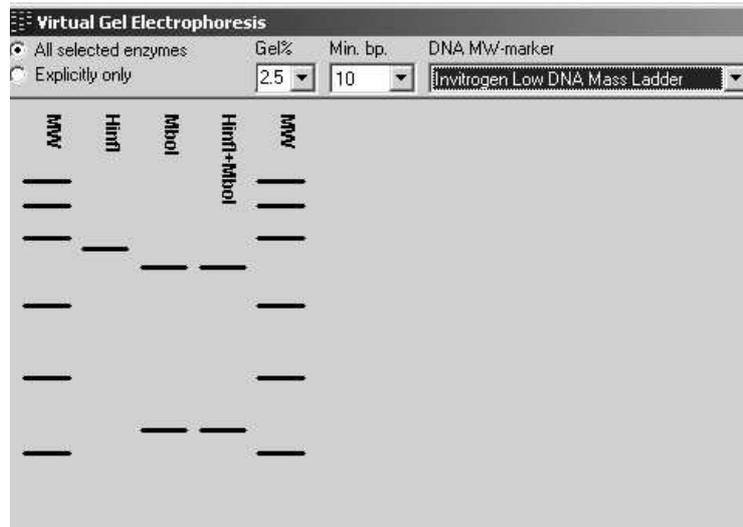


Figura 4.23 - Simulação da eletroforese da dupla digestão do produto de PCR de *M. synoviae* utilizando as enzimas *HinfI* e *Mbol*.

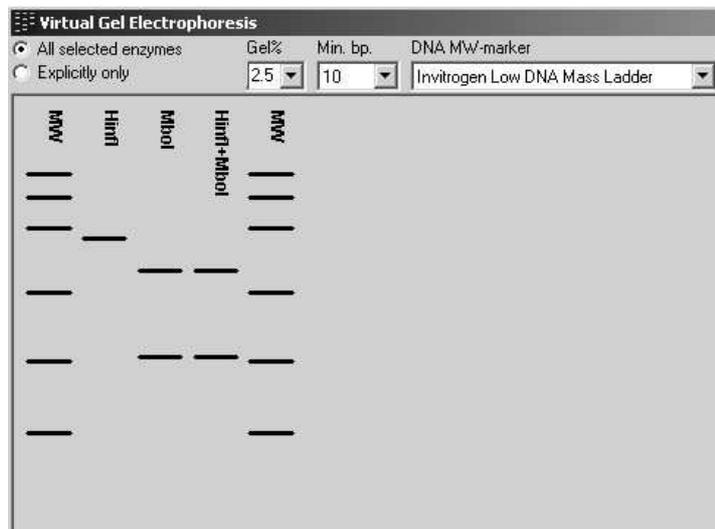


Figura 4.24 - Simulação da eletroforese da dupla digestão do produto de PCR de *M. pneumoniae* utilizando as enzimas *HinfI* e *Mbol*.

4.15 – Digestão dos produtos de PCR

Para confirmar os resultados obtidos *in silico* foi realizada a digestão dos produtos de PCR das cepas *M. gallisepticum* ATCC 15302, *M. synoviae* (CR 538631) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492), utilizando as enzimas *Mbol* e *Hinfl* (Figura 4.25).

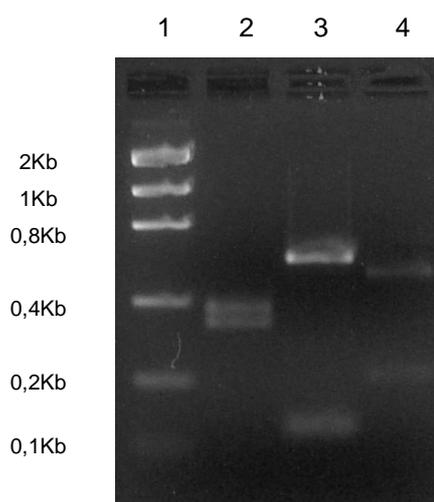


Figura 4.25: Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos digeridos com as enzimas de restrição *Mbol* e *Hinfl*. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: *M. gallisepticum*; 3: *M. synoviae* e 4: *M. pneumoniae*

4.16 – Estabelecimento do limite de detecção em unidades formadoras de colônias para as cepas *M. synoviae* (CR 538631) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492) nos produtos intermediários da vacina contra febre amarela

Com o objetivo de estabelecer a concentração mínima de micoplasmas que poderiam ser detectados pela metodologia proposta, foram utilizados o PAG 071VFA005Z e a suspensão viral 05FCE049, intencionalmente contaminados com concentrações decrescentes de *M. synoviae* e *M. pneumoniae*. Estas contaminações foram realizadas utilizando tubos de 1 mL, quantificados pelo método direto, provenientes dos bancos celulares de cada uma das espécies.

Para a cepa de *M. synoviae* o limite de detecção determinado, nas diluições utilizando o PAG 071VFA005Z, foi de aproximadamente 6,2 UFC/mL (Figura 4.26). Já, nas diluições utilizando a suspensão viral 05FCE049, foi de aproximadamente 12,5 UFC/mL (Figura 4.27). Para a cepa de *M. pneumoniae* o limite de detecção determinado, nas diluições utilizando o PAG 071VFA005Z, foi de aproximadamente 3,1 UFC/mL (Figura 4.28). Já, nas diluições utilizando a suspensão viral 05FCE049, foi de aproximadamente 6,2 UFC/mL (Figura 4.29).

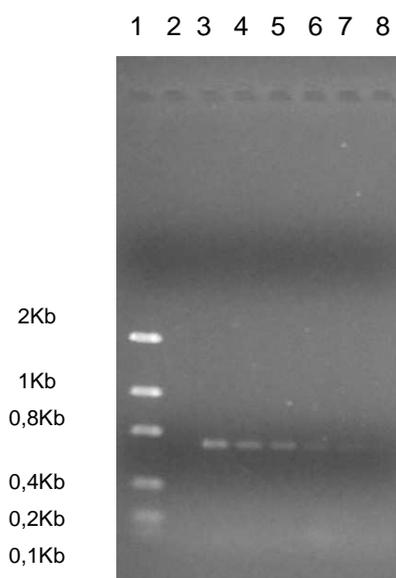


Figura 4.26: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. synoviae* no PAG 071VFA005Z. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Produto intermediário; 3: Produto intermediário com 100 UFC/mL; 4: Produto intermediário com 50 UFC/mL; 5: Produto intermediário com 25 UFC/mL; 6: Produto intermediário com 12,5 UFC/mL; 7: Produto intermediário com 6,2 UFC/mL; 8: Produto intermediário com 3,1 UFC/mL.

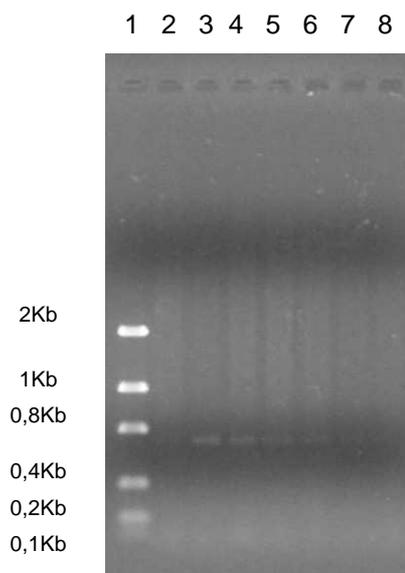


Figura 4.27 - Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. synoviae* na suspensão viral 05FCE049. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Produto intermediário; 3: Produto intermediário com 100 UFC/mL; 4: Produto intermediário com 50 UFC/mL; 5: Produto intermediário com 25 UFC/mL; 6: Produto intermediário com 12,5 UFC/mL; 7: Produto intermediário com 6,2 UFC/mL; 8: Produto intermediário com 3,1 UFC/mL.

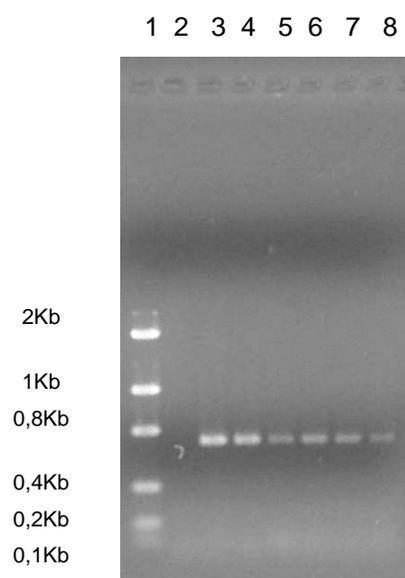


Figura 4.28: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. pneumoniae* no PAG 071VFA005Z. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Produto intermediário; 3: Produto intermediário com 100 UFC/mL; 4: Produto intermediário com 50 UFC/mL; 5: Produto intermediário com 25 UFC/mL; 6: Produto intermediário com 12,5 UFC/mL; 7: Produto intermediário com 6,2 UFC/mL; 8: Produto intermediário com 3,1 UFC/mL.

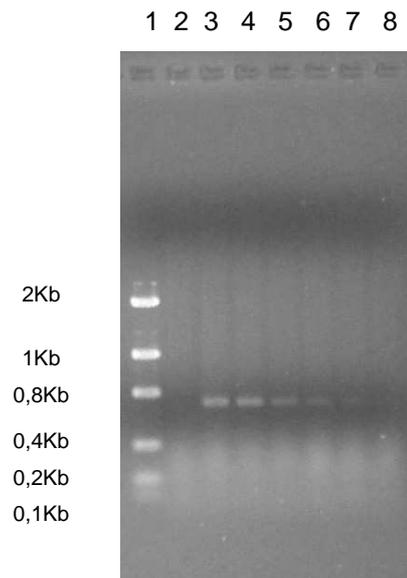


Figura 4.29: Reação em cadeia da polimerase (PCR) para as diluições de *M. pneumoniae* na suspensão viral 05FCE049. 1: Padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder); 2: Produto intermediário; 3: Produto intermediário com 100 UFC/mL; 4: Produto intermediário com 50 UFC/mL; 5: Produto intermediário com 25 UFC/mL; 6: Produto intermediário com 12,5 UFC/mL; 7: Produto intermediário com 6,2 UFC/mL; 8: Produto intermediário com 3,1 UFC/mL.

5 – DISCUSSÃO

Nosso objetivo no presente estudo foi desenvolver e padronizar metodologias baseadas em técnicas de biologia molecular para a detecção de micoplasmas nos produtos intermediários das etapas do processo de produção da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz, de forma a assegurar com maior rapidez a ausência deste agente adventício no produto final. Selecionamos a região evolutivamente conservada do rDNA 16S pela abundância de espécies potencialmente detectáveis. Geralmente, a análise por PCR para detecção de eventuais contaminações causada por micoplasmas requer oligonucleotídeos iniciadores que sejam específicos para determinadas espécies e que permitam a discriminação entre os micoplasmas e os possíveis contaminantes que não sejam micoplasmas. Além disso, a metodologia deve ser livre de amplificações inespecíficas com as amostras analisadas (Sung *et al.* 2006).

Por recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) o teste de detecção de micoplasmas, para demonstrar a esterilidade em produtos biológicos, deve ser realizado pela cultura do microrganismo em meios líquidos e sólidos (método direto) ou pelo teste de infecção em culturas de células seguido de coloração de DNA (DAPI ou Hoechst). Quando o teste é prescrito para o banco de células mestre, para o banco de células de trabalho, para o lote semente de vírus ou para culturas celulares utilizadas como controles, pode ser utilizado o método de cultura ou mesmo o teste de infecção em culturas de células seguida de coloração de DNA. Quando o teste para micoplasmas é prescrito para concentrado viral, produto acabado a granel ou produto final, deve ser utilizado obrigatoriamente o método de cultura. O teste de infecção em culturas de células seguida de coloração de DNA, pode ser utilizado quando necessário, para aprovação de meios de cultura. Métodos alternativos podem ser utilizados desde que tenham sido validados comparativamente com os métodos descritos (WHO 1998^a). Sendo assim é permitida a utilização de métodos alternativos, como o PCR, desde que este seja validado em comparação com a cultura.

Com a abundância de testes e tecnologias disponíveis, o laboratório deve considerar quais fatores são mais importantes para alcançar os resultados desejados antes de escolher uma metodologia baseada em ácidos nucleicos. A primeira pergunta é: existe a real necessidade de implementar uma metodologia baseada em ácidos nucleicos ou os métodos tradicionais são adequados para produzir resultados confiáveis e rápidos (Mothershed & Whitney 2006)? Porém, no caso específico dos testes para detecção de micoplasmas, o método direto além de ser laborioso e demorado apresenta ainda outras peculiaridades como a sensibilidade dos micoplasmas a alguns antibióticos utilizados nas amostras analisadas e a necessidade da utilização de mais de um tipo de meio de cultura para identificação das diferentes espécies de micoplasmas contaminantes. Além disso, a leitura das placas deve ser realizada com auxílio de microscópio com um aumento de 50 a 100X e por operador experiente já que as colônias características em formato de “ovo frito” podem ser confundidas com gotículas de água ou mesmo bolhas de ar no meio sólido.

Nos requerimentos da OMS, está descrito que para o teste de detecção de micoplasmas, caso os produtos testados contenham substâncias inibitórias deve ser realizada a neutralização das mesmas (por exemplo, pela diluição da amostra), antes que o teste seja realizado. Durante a produção da vacina contra febre amarela em Bio-Manguinhos, mais precisamente na formulação do produto acabado a granel, são adicionados os antibióticos canamicina e eritromicina. Sendo assim é necessária a inibição destes antibióticos pela diluição dos produtos intermediários antes da realização do método direto para detecção de micoplasmas. No teste de esterilidade para fungos e bactérias, antes de iniciar a inoculação direta da amostra, os níveis de atividade bacteriostática e fungistática devem ser determinados. Se a amostra demonstrar atividade bacteriostática e ou fungistática a técnica de filtração em membrana é geralmente utilizada para coletar fungos e bactérias contaminantes e assim contornar os efeitos bacteriostáticos e ou fungistáticos da amostra.

Sasaki e colaboradores em 1996 indicaram que o teste para detecção de micoplasmas viáveis (método direto) era inadequado para vacinas virais contendo determinados antibióticos (canamicina, estreptomicina e/ou eritromicina). Caso uma contaminação por micoplasmas ocorresse durante a propagação viral a possibilidade de crescimento e sobrevivência dos micoplasmas nas vacinas virais produzidas no Japão era bastante baixa. Portanto os autores propuseram a padronização de um teste de filtração utilizando membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poros de 0,1µm. Os resultados, deste teste de filtração em membrana para a detecção de micoplasmas, mostraram uma boa recuperação destes microrganismos, sem demonstrar perda de viabilidade, porém a taxa de fluxo destas vacinas, pela membrana foi consideravelmente baixo, inviabilizando a aplicação deste teste na rotina de produção (Sasaki 1996).

O método clássico para o diagnóstico de micoplasmas (método direto) não se mostra abrangente para a grande quantidade de espécies existentes. Além disso, certos micoplasmas, como por exemplo, cepas de *M. hyorhinis* não podem ser detectadas pela cultura (Sung *et al.* 2006). Já, o PCR permite não só o diagnóstico de micoplasmas em culturas celulares como permite a determinação da espécie contaminante, desde que sejam inseridas etapas posteriores de identificação, como sequenciamento ou RFLP. Entretanto, a utilização de dois métodos é recomendada como uma boa estratégia para minimizar os falso-resultados (Timenetsky *et al.* 2006).

Os primeiros relatos sobre a aplicação do PCR para diagnosticar infecções por micoplasmas apareceram em 1989. Existem três principais variantes da detecção de micoplasmas baseada em PCR: 1) Detecção de qualquer infecção por micoplasma (PCR gênero-específico); 2) Detecção de uma única espécie de micoplasma (PCR espécie-específico) e 3) Identificação da espécie de micoplasma pelo PCR espécie-específico ou PCR gênero-específico seguido pelo seqüenciamento do produto de PCR ou análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos – RFLP (Uphoff & Drexler 2002^a).

van Kuppeveld e colaboradores demonstraram em 1992 que seus resultados para a detecção e identificação de micoplasmas, utilizando os iniciadores oligonucleotídeos GPO-1 e MGSO, eram bastante encorajadores no que diz respeito a sensibilidade e especificidade, porém deveria ser avaliada a adaptabilidade de tal metodologia para o diagnóstico em amostras clínicas humanas, assim como para roedores utilizados em laboratório e culturas celulares infectadas.

Geralmente, oligonucleotídeos iniciadores universais que são complementares às regiões mais conservadas do rDNA são capazes de detectar outras bactérias além dos micoplasmas, o que possibilita substancialmente a ocorrência de resultados falso-positivos, uma vez que contaminações bacterianas comuns podem ser facilmente detectadas em uma cultura celular. PCR espécie-específico são geralmente utilizados em exames clínicos e não para a detecção rotineira de micoplasmas em culturas de células. Parece satisfatório utilizar um PCR gênero-específico apenas para detectar a infecção causada pelos micoplasmas mesmo sem especificar a espécie contaminante (Uphoff & Drexler 2002^a).

Como qualquer novo teste laboratorial, a discussão prévia para determinar o nível de entendimento e de interesse é um pré-requisito. Uma vez que o trabalho de levantamento bibliográfico estiver completo, uma avaliação preliminar, utilizando protocolos publicados ou mesmo concentrações padrão para os vários componentes da reação de PCR é um pré-requisito (Forbes 2003). Testamos diversos tipos de extração de DNA, iniciando com método clássico de fenol/clorofórmio. Os experimentos com os oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO, utilizando a extração por fenol/clorofórmio para extrair o DNA das cepas *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. orale* (SEPIN Bio) evidenciaram a possibilidade de que uma metodologia baseada na amplificação do rDNA poderia ser estabelecida para a identificação de micoplasmas. Foram obtidos produtos de PCR com até 0,4 pg de DNA extraído de cada um dos micoplasmas. Avaliamos também a possibilidade da utilização de uma extração de DNA por fervura com a finalidade de diminuir a manipulação de reagentes químicos perigosos e agilizar o processo de identificação de micoplasmas. Esta extração de DNA seguida de PCR mostrou bons resultados tanto na sensibilidade, pois evidenciou a presença 70 UFC/mL das cepas *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. orale* (SEPIN Bio) em três lotes distintos, intencionalmente contaminados, de cada um dos produtos intermediários (PAG e suspensão viral), quanto na especificidade pois não reagiu com os produtos intermediários nem mesmo com as outras espécies bacterianas testadas.

Para demonstrar a reprodutibilidade da metodologia foi preparado um protocolo operacional padronizado e várias amostras de produtos intermediários foram testadas utilizando a extração de DNA por fervura e os oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO, com isso avaliamos a adequação desta metodologia frente ao controle de qualidade da vacina de febre amarela. Todas as amostras testadas por PCR foram testadas também pelo método direto, onde obtivemos os mesmos resultados, ou seja, não foi evidenciada a presença de micoplasmas contaminantes em nenhuma das amostras testadas por ambas as metodologias. Entretanto, foi evidenciada uma considerável variação da qualidade do DNA extraído pela técnica de fervura onde foram observados rastros de DNA quando a amostra era fracionada em géis de agarose indicando uma possível degradação do DNA extraído, principalmente quando era utilizada a suspensão viral.

Para que a metodologia de extração continuasse com agilidade necessária para atender a rotina de análise dos produtos intermediários da produção da vacina de febre amarela, mas que apresentasse também uma reprodutibilidade garantida e um maior grau de pureza do DNA extraído, adotamos como procedimento para extração de DNA o kit Wizard SV Genomic DNA Purification System.

A confiabilidade dos resultados produzidos pelos testes baseados em ácidos nucléicos é diretamente proporcional à qualidade do ácido nucléico que será testado. A presença de inibidores nas amostras, por exemplo, pode interferir com o PCR e causar resultados falso-negativos. Portanto a seleção do método de extração apresenta uma importância crítica. Muitos kits de extração comercialmente disponíveis utilizam tampões de lise bacteriana e uma matriz de sílica (tipicamente em formato de coluna) para purificar o DNA ou RNA. Muitos passos de lavagem são utilizados para remover proteínas e outras macromoléculas, e o DNA ou RNA purificado é eluído da membrana utilizando tampões de baixa salinidade. Grande parte dos métodos clássicos de extração requer uma grande quantidade de centrifugações. Para reduzir a manipulação de amostras, erro de operador e a contaminação das amostras, métodos semi-automatizados para extração de DNA ou RNA foram desenvolvidos e estão disponíveis no mercado (Mothershed & Whitney 2006). No caso de uma metodologia baseada na amplificação de DNA por PCR, como proposto nesse trabalho, ser incorporada na rotina de testagem de amostras de produtos intermediários das vacinas ou mesmo em culturas celulares, seria recomendável a aquisição desse tipo de equipamento.

Neste trabalho, inicialmente utilizamos cepas de micoplasmas cedidas: *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) e *M. orale* (SEPIN Bio). Posteriormente foram adquiridos os micoplasmas de referência. *M. gallisepticum* (ATCC 15302), *M. pneumoniae* (ATCC 15492) e *M. synoviae* (CR 538631). Utilizando o meio de cultura PPLO, que foi adaptado neste trabalho, pudemos observar o crescimento característico das quatro cepas utilizadas para construir os bancos celulares de micoplasmas a seguir: *M. gallisepticum* (ATCC 15302), *M. pneumoniae* (ATCC 15492) e *M. synoviae* (CR 538631) e *M. orale* (SEPIN Bio). O American Type Culture Collection (2006) recomenda que estas espécies de micoplasmas sejam cultivadas em três diferentes meios de cultura. O fato de desenvolvermos um meio de cultura eficiente para o crescimento de todas as espécies de micoplasmas utilizadas atualmente em Bio-Manguinhos torna o cultivo destes microrganismos um pouco menos laborioso. Além disso, o cultivo eficiente destes microrganismos permitiu a elaboração de bancos de micoplasmas que puderam ser quantificados em unidades formadoras de colônias. Esses bancos possibilitam uma reprodutibilidade dos ensaios propostos neste trabalho.

A partir de alíquotas dos nossos bancos de micoplasmas quantificados, para cada uma das espécies utilizadas, foi realizada extração de DNA utilizando o kit comercial e PCR com a temperatura de anelamento de 63°C. Não foram evidenciados produtos de PCR da cepa *M. gallisepticum* ATCC 15302. Foram realizados experimentos utilizando uma temperatura de anelamento mais baixa (55°C), entretanto além da amplificação do DNA de *M. gallisepticum* foi evidenciada também a formação de produtos de PCR a partir dos produtos intermediários da vacina contra febre amarela (PAG e suspensão viral), indicando que os iniciadores GPO-1 e MGSO apresentam algum grau de complementaridade com o DNA contido nos produtos intermediários da vacina contra febre amarela.

Nos seqüenciamentos realizados a partir dos produtos de PCR a cepa de *M. orale* (SEPIN Bio), gentilmente cedida pela Universidade de São Paulo, cultivada e estocada no Setor de Processos e Insumos, apresentou uma seqüência de 714 pb com 99% de homologia com a seqüência de *M. iowae* (AM073012) e 79% com *M. orale* (AY796060). Devido ao fato da cepa *M. orale* (SEPIN Bio) não ser uma cepa de referência e principalmente pela considerável relação com a seqüência de *M. iowae* esta cepa foi excluída de nossas análises.

Existe uma real necessidade de adquirir cepas de referência das quatro espécies de micoplasmas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde para o controle de qualidade dos produtos intermediários da vacina contra febre amarela, assim como outras espécies para podermos garantir com um maior grau de certificação e qualidade a ausência de eventuais micoplasmas contaminantes no produto final.

Foi observada uma considerável diferença na eficiência da amplificação pela metodologia proposta, entre as diferentes cepas de *M. gallisepticum* utilizadas no presente estudo (SEPIN Bio e ATCC 15302). A cepa de *M. gallisepticum* (SEPIN Bio) apresentou produtos de PCR esperados, com 714 pares de bases, a partir de 70 UFC/mL, enquanto que a cepa ATCC 15302 evidenciou a presença de produtos de PCR apenas quando ocorreu uma diminuição na temperatura de anelamento e mesmo assim apenas em altas concentrações ($43,6 \times 10^4$ UFC/mL e $43,6 \times 10^3$ UFC/mL). Observando o alinhamento das seqüências dos produtos de PCR das cepas de *M. gallisepticum* SEPIN Bio e ATCC 15302 com as seqüências L08897, AM075207 e AE015450 (Apêndice I), foi possível identificar que o iniciador MGSO difere de 5 em 27 bases frente às seqüências de *M. gallisepticum* L08897, AM075207 e AE015450, indicando uma possível dificuldade do anelamento deste oligonucleotídeo no rDNA destas cepas em condições de alta estringência no PCR. Como estas cepas de *M. gallisepticum*, analisadas no presente estudo, foram amplificadas e seqüenciadas utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores (GPO-1 e MGSO), é esperado que apresentem a seqüência dos mesmos em sua extremidade. Para evidenciar com clareza a verdadeira seqüência das extremidades desses produtos de PCR seria necessário desenhar oligonucleotídeos iniciadores, mais externos. Adicionalmente, observamos similaridade não só nas extremidades, mas sim em toda a seqüência dos produtos de PCR destas duas cepas.

Além disso, foram realizadas análises dos oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO, utilizando o programa Primer Analysis da Cybergene (CyberGene AB 2007) para evidenciar a existência de estruturas em forma de grampo e/ou seqüências palindrômicas (tabela 5.1). Na seqüência do oligonucleotídeo GPO-1 foi evidenciada uma estrutura em forma de grampo. Já, na seqüência do Iniciador MGSO foi evidenciada uma estrutura palindrômica.

Tabela 5.1: Análise dos oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO.

Iniciador	Estrutura	Exemplo
GPO-1	Grampo	5' -----> 3' ACTCCTACGG ATGACGACGGAG 3' <----- 5'
MGSO	Palíndrome	5' -----> 3' TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC CTCCAATTGTCTCACTGTCTACCACTG 3' <----- 5'

Os oligonucleotídeos iniciadores GPO-1 e MGSO, não foram eficientes em amplificar o rDNA da cepa de *M. gallisepticum* (ATCC 15302). Portanto é necessário utilizar outros pares de oligonucleotídeos iniciadores para avaliar sua eficiência e adaptabilidade tanto para os micoplasmas utilizados quanto para os produtos intermediários da vacina contra febre amarela. Foram testados em uma reação de PCR, além dos oligonucleotídeos GPO-1 e MGSO, os oligonucleotídeos internos, utilizados no seqüenciamento (RLF-1 e GPO-3) e todas as vezes que o oligonucleotídeo iniciador MGSO foi utilizado na foram evidenciados produtos de PCR. Sendo assim, acreditamos que este iniciador não apresenta complementaridade suficiente para amplificar o DNA desta cepa de *M. gallisepticum* com uma temperatura de anelamento de 63°C.

Eldering e colaboradores em 2004 relataram que o par de iniciadores GPO-3 e MGSO amplificam o rDNA não só dos micoplasmas como também de diversas cepas de bactérias Gram-positivas. Nossos resultados, utilizando o oligonucleotídeo RLF-1, que é inverso e complementar ao GPO-3, confirmam esta observação. Evidenciamos a amplificação de produtos de PCR tanto utilizando o DNA extraído a partir dos produtos intermediários da vacina contra febre amarela quanto dos outros microrganismos testados: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), (dados não mostrados).

Sendo assim não é possível a utilização destes oligonucleotídeos internos para implementação da metodologia proposta neste trabalho.

A avaliação de novos oligonucleotídeos poderia ser realizada utilizando os oligonucleotídeos que estão descritos na farmacopéia japonesa (Japanese Pharmacopeia 2001), os utilizados pelo grupo do Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, o DSMZ (Uphoff e Drexler 2002^b) e aqueles que serão desenhados a partir do alinhamento das seqüências depositadas no GenBank. Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados em Bio-Manguinhos devem levar em consideração o não alinhamento com seqüências de *Gallus gallus*.

Foram realizados experimentos para a identificação da espécie de micoplasma pela digestão do produto gerado por PCR, (polimorfismo do comprimento dos fragmentos da restrição - RFLP). Sendo assim, existe a possibilidade de identificar uma eventual contaminação por micoplasmas a partir da detecção por PCR seguida de RFLP. Entretanto é necessário, adquirir todos micoplasmas de referência recomendados pela Organização Mundial de Saúde para vacinas de uso humano (*M. pneumoniae* e *M. orale*), e quando material aviário é utilizado na produção destas vacinas (*M. gallisepticum* e *M. synoviae*), assim como, estabelecer o perfil de restrição para cada uma destas espécies.

A organização Mundial de saúde preconiza que a menor concentração de micoplasmas detectada, para demonstrar as propriedades nutritivas do meio de cultura utilizado no método direto, deve ser entre 200 e 400 UFC por placa de meio sólido e entre 20 e 40 UFC por tubo de meio líquido. O critério de aprovação é a observação de crescimento adequado no meio sólido e mudança na coloração no meio líquido (WHO 1998^a). A metodologia proposta, neste trabalho, foi capaz de detectar concentrações de micoplasmas nos produtos intermediários menores do que as preconizadas pela OMS. Utilizando a cepa de *M. synoviae* (CR 538631) nas diluições em PAG 071VFA005Z foi evidenciada a presença de produtos de PCR em até aproximadamente 6,2 UFC/mL. Já, nas diluições com a suspensão viral 05FCE049, foi evidenciada a formação de produtos de PCR em até aproximadamente 12,5 UFC/mL. Para a cepa de *M. pneumoniae* (ATCC 15492) nas diluições utilizando o PAG 071VFA005Z, a amplificação de DNA ocorreu até aproximadamente 3,1 UFC/mL.

Já, nas diluições utilizando a suspensão viral 05FCE049, a amplificação de DNA ocorreu até aproximadamente 6,2 UFC/mL. Sendo assim a metodologia proposta, pelo menos para as cepas *M. synoviae* (CR 538631) e *M. pneumoniae* (ATCC 15492) apresentou uma sensibilidade superior às recomendações da Organização Mundial de Saúde.

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação do método analítico permite demonstrar que o método é adequado ao uso pretendido. Algumas características investigadas no processo de validação, como especificidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa de aplicação e robustez tem a finalidade de demonstrar o desempenho do método (Guideline on General Principles of Process Validation 1987).

Para a validação analítica, de um teste qualitativo como o PCR, é essencial determinar a sensibilidade e a especificidade analítica do ensaio. A sensibilidade analítica, ou o limite inferior de detecção refere-se ao menor número de organismos que pode ser, confiável e reprodutivelmente, detectado pelo ensaio. Este processo deve realizado pela diluição do agente infeccioso em amostras que sabidamente não contenham a seqüência alvo. Os ácidos nucléicos são extraídos de cada diluição e testados pelo protocolo otimizado, todos os controles devem ser inseridos. A especificidade analítica refere-se à reatividade com organismos relacionados e não relacionados (Forbes 2003 e Conraths & Schares 2006). Outra importante característica de qualquer ensaio de amplificação de DNA é a utilização de controles apropriados. Devido à alta sensibilidade do PCR, existe a possibilidade de uma eventual contaminação das amostras testadas, onde mesmo pequenas quantidades de DNA contaminante ($2 \times 10^{-8} \mu\text{L}$ contidos em aerossóis) podem ocasionar resultados falso-positivos. Portanto, deve ser introduzido um número suficiente de controles negativos (pelo menos 10% do número de amostras), os quais devem ser submetidos às mesmas condições das amostras testadas. Este reagente ou controle negativo deve conter tudo, menos a seqüência alvo com intuito de prevenir uma contaminação cruzada. Além disso, a inclusão de um controle positivo contendo um baixo número de cópias da seqüência alvo é requisito para cada rodada de testes.

Adicionalmente, medidas incluindo o desenvolvimento de espaços de trabalho individualizados para a prática das atividades (áreas separadas fisicamente para os processos de pré- e pós-amplificação) e outras medidas de prevenção de eventuais contaminações e técnicas meticulosas de precaução no laboratório, utilização de ponteiros com barreira assim como, material separado de acordo com tipo de metodologia, uso de luvas e jalecos descartáveis devem ser empregadas (Forbes 2003).

Atualmente Bio-Manguinhos participa de processos de transferência de tecnologia para produção de insumos do interesse direto do Ministério da Saúde como, por exemplo, a vacina tríplice viral contra sarampo, caxumba e rubéola (TVV) e o biofármaco eritropoietina recombinante (EPO), ambos produzidos utilizando culturas celulares. Estas transferências de tecnologia são realizadas por acordos com a Glaxo-Smith-Kline (Bélgica) e pelo Centro de Imunologia Molecular (Cuba) respectivamente. Além disso, alguns laboratórios da Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico realizam projetos envolvendo a utilização de culturas celulares. Sendo assim, seria interessante a implementação de uma metodologia rápida e certificada para detecção de eventuais contaminações por micoplasmas em culturas de celulares utilizadas em Bio-Manguinhos. A contaminação por micoplasmas é de longe o maior problema relacionado aos cultivos celulares. Cerca de 30% das culturas celulares, variando entre 15 e 80% dependendo da fonte de suprimento, foram reportadas como contaminadas (Uphoff e Drexler 2002^b). A infecção causada por micoplasmas em culturas celulares pode gerar diferentes efeitos citogenéticos. Geralmente micoplasmas aderem às células infectadas, porém dependendo da espécie podem se fundir ou mesmo invadir a célula hospedeira. Estas bactérias podem esgotar os nutrientes das culturas celulares e interferir na resposta destas células quando desafiadas experimentalmente (Timenetsky *et al.* 2006). Seria interessante utilizar também os principais contaminantes de culturas celulares (*Acholeplasma laidlawii*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. salivarium*, *M. fermentans* e *M. hyorhinis*) de modo a aumentar a eficiência da identificação destes eventuais contaminantes. Desta forma poderia ser padronizada uma metodologia baseada na amplificação de ácidos nucléicos que atendesse tanto aos produtos intermediários da vacina contra febre amarela quanto aos cultivos celulares.

6 – CONCLUSÕES

1) Estabelecemos uma metodologia de extração e amplificação por PCR para identificação de eventuais contaminações por micoplasmas nos produtos intermediários da vacina contra febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

2) Adaptamos o meio PPLO, para o crescimento das cepas de micoplasmas de referência (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*), assim como da cepa de *M. orale* (SEPIN Bio).

3) Desenvolvemos bancos de micoplasmas quantificados das cepas de micoplasmas de referência, assim como da cepa de *M. orale* (SEPIN Bio).

4) Estabelecemos os limites de detecção a partir de culturas de micoplasmas em meio PPLO, assim como a partir de produtos intermediários intencionalmente contaminados.

5) Estabelecemos um ensaio de RFLP capaz de discriminar as cepas de referência, pela digestão dos produtos de PCR utilizando as enzimas *Mbol* e *Hinfl*.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, LFC. **Estudo sobre Diferentes Formulações Visando à Obtenção e à Caracterização da Vacina contra o Vírus da Febre Amarela 17DD nas Apresentações Unidose e em Dez Doses.** Rio de Janeiro, 2005. Mestrado (Tecnologia em Imunobiológicos). Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Fundação Oswaldo Cruz.

American Type Culture Collection (ATCC). [on line]. [Capturado em 18 de novembro de 2006]. Disponível em:

<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=15302>

<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=23714>

<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=25204>

<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=15492>

Bashiruddin JB. **Extraction of DNA from Mycoplasmas** *In*: Miles R & Nicholas R eds. *Mycoplasma Protocols: a Laboratory Manual*. New Jersey, Humana Press Inc.1998 Chap 17.

Benchimol J. **Vacina contra Febre Amarela.** *In*: Febre Amarela a Doença e a Vacina, uma História inacabada 2001; Editora Fundação Oswaldo Cruz.

Bio-Manguinhos/Fiocruz. [on line]. [Capturado em 16 de janeiro de 2007]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br>

Bio-Manguinhos/Fiocruz^a. Procedimento Operacional Padronizado, nº0075: **Promoção de crescimento em meios de cultura para micoplasmas.**

Bio-Manguinhos/Fiocruz^b. Procedimento Operacional Padronizado, nº0188: **Teste de detecção de *Mycoplasma* por coloração de DNA.**

Bio-Manguinhos/Fiocruz^c. Procedimento Operacional Padronizado, nº102210.54 2: **Teste de esterilidade pelo método direto para detecção de micoplasmas.**

Bio-Manguinhos/Fiocruz^d. Procedimento Operacional Padronizado, nº 102210.5 62: **Detecção de micoplasmas através de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR).**

Bork P, Ouzounis C, Casari G, Schneider R, Sander C, Dolan M, Gilbert W & Gillevet PM. **Exploring the *Mycoplasma capricolum* genome: a minimal cell reveals its physiology.** Mol. Microbiol., 1995; 16: 955–967.

Bove JM. **Molecular features of mollicutes.** Clin. Infect. Dis., 1993; 17 (1): 10–31.

_____. **Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates.** Wien. Klin. Wochenschr, 1997; 109: 604–612.

Carle P, Laigret, F Tully JG & Bove JM. **Heterogeneity of genome sizes within the genus *Spiroplasma*.** Int. J. Syst. Bacteriol, 1995; 45: 178–181.

Citti C, Browning GF & Rosengarten R. **Phenotypic Diversity and Cell Invasion in Host Subversion by Pathogenic Mycoplasmas** *In*: Blanchard A & Browning G eds. Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control. Norfolk, Horizon Bioscience. 2005. Chap 13

Conraths FJ & Schares G. **Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory.** Vet. Parasitol, 2006; 136: 91-98.

CyberGene AB. [on line]. [Capturado em 24 de maio de 2007]. Disponível em: <http://www.cybergene.se/primer.html>

Dellepiane N, Griffiths E & Milstien JB. New Challenges in Assuring Vaccine Quality. **Theme Papers. Bulletin of the World Health Organization, 2000; 78 (2): 155-162.**

Domingues D, Nogueira F, Tavira L & Exposto F. **Micoplasmas Que papel nas Infecções Humanas?** Acta Med Port, 2005; 18: 377-384.

Dybvig K & Voelker LL. **Molecular biology of mycoplasmas.** Annu. Rev. Microbiol., 1996; 50: 25–57.

Eldering JA, Felten C, Veilleux CA & Potts BJ. **Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell culture used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins.** Biologicals, 2004; 32: 183-193.

Forbes BA. **Introducing a molecular test into the clinical microbiology laboratory.** Arch. Pathol. Lab. Med., 2003; 127: 1106-1111.

Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, *et al.* **The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*.** Science, 1995; 270: 397–403.

Frey ML, Hanson RP & Anderson DP. **A medium for the isolation of avian mycoplasmas.** Am. J. Vet. Res, 1968; 29 (11): 2163-2171.

Gen-Probe Inc. [on line]. [Capturado em 21 de março de 2007]. Disponível em: http://www.gen-probe.com/prod_serv/std_pace.asp

Gorton TS, Goh MS, & Geary SJ. **Physical mapping of the *Mycoplasma gallisepticum* S6 genome with localization of selected genes.** J. Bacteriol., 1995; 177: 259–263.

Guideline on General Principles of Process Validation. [on line]. 1987 [Capturado em 26 de maio de 2007] Disponível em: <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/pv.htm>

Japanese Pharmacopeia, 14th Edition. [on line]. 2001 [Capturado em 09 de fevereiro de 2007]. Disponível em: <http://jpdn.nihs.go.jp/jp14e/contents.html>

Konemam EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC & Winn WC. **Micoplasmas e Ureaplasmas**. *In*: Konemam EW, Allen DS, Janda WM, Schreckenberger PC & Winn WC eds. Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido. 5ª Edição. São Paulo, Editora Médica e Científica LTDA (MEDSI). 2001. Capítulo 16.

Kong F, James G, Gordon S, Zelynski A & Gilbert GL. **Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture**. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001; 67 (7): 3195-3200.

Namba S, Oshima K & Gibb K. **Phytoplasma Genomics** *In*: Blanchard A & Browning G eds. *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*. Norfolk, Horizon Bioscience. 2005. Chap 4

National Center for Biotechnology Information (NCBI). [online] [Capturado em 4 de maio de 2007]. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Madigan MT, Martinko JM & Parker J. **Prokariotic Diversity: Bacteria**. *In*: Madigan MT, Martinko JM & Parker J eds. *Brock Biology of Microorganisms*. 9th ed. New Jersey, Prentice Hall Inc. 2000. Chap 13

Markham PF & Noormohammadi AH. **Diagnosis of Mycoplasmosis in Animals** *In*: Blanchard A & Browning G eds. *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*. Norfolk, Horizon Bioscience. 2005. Chap 10

Medina HA & Charlton BR eds. **Poultry Mycoplasmas Workshop**. California, University of California, 1994.

Myiata M. **Gliding Motility of Mycoplasmas: The Mechanism Cannot be Explained by Current Biology** *In*: Blanchard A & Browning G eds. *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*. Norfolk, Horizon Bioscience. 2005. Chap 5

Miyata M, Wang L, & Fukumura T. **Physical mapping of the *Mycoplasma capricolum* genome.** FEMS Microbiol. Lett., 1991. 79: 329–334.

Mothershed EA & Whitney AM. **Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and Future considerations for the clinical laboratory.** Clinica Chimica Acta, 2006; 363: 206-220.

Polak-Vogelzang AA, Brugman J & Reijgers R. **Comparison of two methods for detection of Mollicutes (*Mycoplasmatales* and *Acholeplasmatales*) in cell culture in The Netherlands.** Antonie van Leeuwenhoek, 1987; 53: 107-118.

Razin S, Yogeve D & Naot Y. **Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas.** Microbiol Mol Biol Rev., 1998; 62 (4): 1094-1156.

Renaudin J & Lartigue C. **OriC Plasmids as Gene Vectors for Mollicutes** In: Blanchard A & Browning G eds. Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control. Norfolk, Horizon Bioscience. 2005. Chap 1

Rocha E, Sirand-Pugnet P & Blanchard A. **Genome Analysis: Recombination, Repair and Recombinational Hotspots** In: Blanchard A & Browning G eds. Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control. Norfolk, Horizon Bioscience. 2005. Chap 2

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T eds. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2nd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1977; 74 (12): 5463-5467.

Sasaki T, Harasawa R, Shintani M, Fujiwara H, Sasaki Y, Horino A, Kenri T, Ishii K & Chino F. Evaluation of Current Sterility Tests for Human Live Viral Vaccines. **Biologicals, 1996; 24: 51-55.**

Skamrov A, Goldman M, Klasova J, & Beabealashvilli R. ***Mycoplasma gallisepticum* 16S rRNA genes.** FEMS Microbiol. Lett., 1995; 128: 321–325.

Smith LM, Sanders JG, Kaiser RJ, Hughes BP, Dodd C & Connell CR. **Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis.** *Nature*, 1986; 321 (6071): 674-679.

Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Baere TD, Verhelst R, Peeters J, Kruif A, Haesebrouck F & Vaneechoutte M. **Evaluation of a amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of Mycoplasma species.** *BMC Infectious Diseases*, 2005; 5 (1): 46-56.

Stemke G. W, Huang Y, Laigret F, & Bove JM. **Cloning the ribosomal RNA operons of *Mycoplasma flocculare* and comparison with those of *Mycoplasma hyopneumoniae*.** *Microbiology*, 1994; 140: 857–860.

Stothard P, Van Domselaar G, Shrivastava S, Guo A, O'Neill B, Cruz J, Ellison M & Wishart DS. BacMap: an interactive picture atlas of annotated bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 2005; 33: 317-320 [on line]

[Capturado em 21 de abril de 2007]

Disponível em: <http://wishart.biology.ualberta.ca/BacMap/index.html>

Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK & Song S. **PCR-Based Detection of Mycoplasma Species.** *The Journal of Microbiology*, 2006; 4 (1): 42-49

Taschke C, Klinkert MQ, Wolters J & Herrmann R. Organization of the ribosomal RNA genes in *Mycoplasma hyopneumoniae*: the 5S rRNA gene is separated from the 16S and 23S rRNA genes. *Mol. Gen. Genet.*, 1986; 205: 428–433.

Taylor-Robinson D & Bébéar C 1997. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1997; 40: 622-630.

Teyssou R, Poutiers F, Saillard C, Grau O, Laigret F, Bove JM, & Bébéar CM. Detection of Mollicute Contamination in Cell Cultures by 16S rDNA Amplification. *Mol. Cell. Probes*, 1993; 7 (3): 209-216.

Thiaucourt F & Roger F. **Biodiversity of Mycoplasmas and Molecular Epidemiology** In: Blanchard A & Browning G eds. *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*. Norfolk, Horizon Bioscience. 2005. Chap 12

Timenetsky J, Miyaki C, Mendes IF & Rizzo E. Identificação de micoplasmas pela inibição de crescimento de amostras isoladas de culturas celulares, **Rev. Saúde Pública, 1992; 26 (1): 17-20.**

Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M & Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2006; 39: 907-914.**

Tsai S, Wear DJ, Shih JWK & Lo SC. **Mycoplasma and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995; 92: 10197–10201.

Uphoff CC & Drexler HG. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology, 2002^a; 39: 75-90.**

_____. Comparative PCR Analysis for Detection of Mycoplasma Infections in Continuous Cell Lines. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., 2002^b; 38(2): 79-85.**

van Kuppeveld FJM, van der Logt JTM, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WGV, Niesters HGM, *et al.* **Genus- and Species Specific Identification of Mycoplasmas by 16S rRNA Amplification.** Appl. And Envir. Microb., 1992; 58: 2606-2615.

van Kuppeveld FJM, Johansson KE, Galama JMD, Kissing J, Bolske G, Logt JTM *et al.* **Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific PCR.** Appl. And Envir. Microb., 1994; 60: 149-151.

Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF & Kenny GE eds. **Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections.** Washington, D.C. American Society for Microbiology Press 2001.

WHO - World Health Organization. General Requirements for the Sterility Tests of Biological Substances. **Annex 6: Requirements for Biological Substances.** World Health Organization. Tech. Rep. Ser., 1998^a; 872: 69-74.

_____. Requirements for Yellow Fever Vaccine. **Annex 3: Requirements for the Sterility of Biological Substances.** World Health Organization. Tech. Rep. Ser., 1998^b; 872: 31-63.

Wolf M, Müller T, Dandekar T & Pollack JD. **Phylogeny of Firmicutes with special reference to Mycoplasma (Mollicutes) as inferred from phosphoglycerate kinase amino acid sequence data.** Int. J. of Syst. and Evol. Mic, 2004; 54: 871–875.

Zou N, Park K, & Dybvig K. **Mycoplasma virus P1 has a linear, double-stranded DNA genome with inverted terminal repeats.** Plasmid, 1995; 33: 41–49.

8 – APÊNDICE

Alinhamento nucleotídico das seqüências das cepas de *M. gallisepticum* utilizadas neste trabalho frente às seqüências depositadas no GenBank. Somente os nucleotídeos diferentes são indicados. As seqüências grifadas em verde e amarelo correspondem aos oligonucleotídeos GPO-1e MGSO respectivamente.

9 – Anexo

Procedimento Operacional Padronizado Nº 102210.562. Detecção de Micoplasmas através de Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

ANEXO I: Procedimento Operacional Padronizado de Bio-Manguinhos.

TÍTULO: DETECÇÃO DE MICOPLASMAS ATRAVÉS DE AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

**NÚMERO
102210.562**

SUMÁRIO

1. OBJETIVO
2. CAMPO DE APLICAÇÃO
3. REFERÊNCIAS
4. DEFINIÇÕES
5. SIGLAS
6. RESPONSABILIDADES
7. CONDIÇÕES GERAIS
8. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS
9. RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS
10. FOLHA DE APROVAÇÃO

1. OBJETIVO

Este procedimento descreve a metodologia utilizada para a extração de DNA total em amostras de suspensão viral (produto intermediário) e bulk (produto acabado à granel) da vacina contra febre amarela, utilizando o método de fervura seguido da metodologia utilizada para a amplificação de fragmentos de DNA específicos (neste caso de Micoplasma), a partir de uma amostra, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao Laboratório de Controle Microbiológico – Setor de Testes Bioquímicos e Moleculares do Departamento de Controle de Qualidade.

3. REFERÊNCIAS

- INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J. & WHITE, T.J. 1990. **PCR Protocols A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA
- KUPPEVELD FJM, JOHANSSON KE, GALAMA JMD, KISSING J, BOLSKE G, LOGT JTM & MELCHERS WJG 1994. **Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific PCR**. Appl. And Envir. Microb., 60: 149-151.
- MILES R & NICHOLAS R 1998. **Mycoplasma Protocols: a Laboratory Manual**, New Jersey, Humana Press Inc.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF & MANIATIS T 1989. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2nd ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

4. DEFINIÇÕES

4.1- **NUCLEASE** - denominação genérica para enzimas que degradam ácidos nucléicos (ex.: RNase, DNase).

4.2- **OLIGONUCLEOTÍDEOS** - segmento curto de DNA sintético (iniciador).

4.3- **OLIGONUCLEOTÍDEO ANTI-SENSO** - iniciador complementar utilizado na síntese de DNA durante a amplificação (PCR). Sinonímia: iniciador reverso, iniciador negativo (em inglês – reverse).

4.4- **OLIGONUCLEOTÍDEO SENSO** - iniciador complementar utilizado na síntese de DNA durante a amplificação (PCR). Sinonímia: iniciador positivo (em inglês – forward).

4.5- **TAQ DNA POLIMERASE** - enzima que sintetiza novos filamentos de DNA a partir de um molde de DNA (alvo) e de um par de oligonucleotídeos iniciadores.

4.6- **PCR** - reação em cadeia da polimerase que emprega enzimas termoativas em ciclos de desnaturação, polimerização e extensão de filamentos de DNA.

4.7- **DESOXIRIBONUCLEOTÍDEOS TRIFOSFATADOS**- nucleotídeos compostos por uma desoxirribose, uma base nitrogenada e três grupos fosfato; são adicionados pela polimerase, formando a nova fita de DNA.

4.8- **PROTEINASE K** - enzima, utilizada para degradar proteínas contaminantes (derivada de fungo *Tritirachium album Limber*).

5. SIGLAS

DNA	- Ácido Desoxiribonucléico (sigla em português = ADN)
PBS	- Phosphate Buffered Saline (Tampão Salina Fosfato)
PCR	- Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
DEQUA	- Departamento de Controle de Qualidade
DNase	- Enzima que degrada DNA
LACOM	- Laboratório de Controle Microbiológico
Milli-Q	- Água ultra pura
g	- medida de centrifugação (relacionada a rpm, ou seja, Rotação por Minuto específica de cada centrífuga)
dNTP mix	- Mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dGTP, dATP, dCTP e dTTP)
pb	- Pares de bases
Kb	- kilo pares de bases = 1000 pares de bases
GPO-1	- Oligonucleotídeo senso específico para <i>Mycoplasma sp.</i>
MGSO	- Oligonucleotídeo anti-senso específico para <i>Mycoplasma sp.</i>

6. RESPONSABILIDADES

6.1- Do LACOM

– Realizar a extração do DNA total e submeter as amostras à amplificação por PCR para detecção de *Mycoplasma* e fornecer resultados através da emissão de laudos.

6.2- Do DEQUA

– Preencher o protocolo de liberação do produto de acordo com os resultados do teste realizado pelo LACOM e de acordo com os laudos emitidos por este laboratório.

7. CONDIÇÕES GERAIS

- A extração de DNA total descrita neste procedimento destina-se à posterior detecção de micoplasmas (agentes adventícios) em fluidos biológicos por PCR.

- A alta sensibilidade da técnica de PCR pode representar um grave problema, caso algumas medidas de segurança e determinados procedimentos especiais não sejam tomados:

a) As condições de organização física e metodológica do laboratório devem obedecer algumas regras básicas com o objetivo de evitar contaminações e conseqüentemente resultados falso-positivos. Preferencialmente, os ambientes utilizados para o isolamento dos ácidos nucléicos e para a preparação da reação de PCR devem ser separados, bem como os insumos e micropipetas e ponteiras utilizados para tal. É imprescindível o uso de luvas durante todo o processo.

b) As condições da reação em cadeia da polimerase devem estar otimizadas, principalmente a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos, a fim de permitir um anelamento eficiente entre o oligonucleotídeo e o DNA molde e evitar possíveis amplificações de regiões inespecíficas do DNA molde.

c) Introduzir tanto na extração de DNA molde com na reação de PCR controles positivos, ou seja, cultura pura de *Mycoplasma sp.* e DNA de *Mycoplasma sp.* respectivamente. É necessário manipular com cuidado os controles positivos, evitando aerossóis para que não haja contaminação cruzada e nem do ambiente. Inserir na reação de PCR um controle negativo da mistura de reação sem DNA molde.

- Para análise dos resultados se faz necessária a utilização do brometo de etídio, um material que se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA e possibilita a visualização dos fragmentos de DNA sob irradiação de luz ultra-violeta. Porém, o brometo de etídio é tóxico e deve ser descartado separadamente (lixo químico). Devido à toxicidade, são necessários cuidados para manipulação do brometo de etídio, tais como: uso de luvas pelos manipuladores e a separação dos materiais utilizados frente aos demais materiais não-contaminados.

- Ao término dos trabalhos, os operadores devem deixar o local arrumado, encaminhando todo o material usado para descontaminação, descarte, lavagem e/ou reciclagem.

7.1- Material e Insumos

- Tubos novos de 1,5mL livres de nucleases
- Ponteiras novas livres de nucleases
- Micropipetas automáticas de 20µl, 200µl e 1000µl
- Vortex
- Bloco térmico aquecido (à 100°C)
- Banho-maria (à 37°C)

- Microcentrífuga para tubos de 1,5mL
- Suporte para tubos de 1,5mL
- Caneta para identificação
- Descarte para material contaminado
- Autoclave
- Isopor contendo gelo
- Água Milli-Q livre de nucleases
- PBS estéril
- Luvas descartáveis
- Congelador -20°C
- Tubos novos de 0,2mL de parede fina, livres de nucleases
- Suporte para tubos de 0,2mL
- Termociclador
- Oligonucleotídeos senso e anti-senso (GPO-1 e MGSO)
- Solução de MgCl₂
- Solução tampão da reação de PCR
- Desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dGTP, dATP, dCTP e dTTP)
- Taq DNA polimerase
- Proteinase K
- Cuba, forma e pente para eletroforese de DNA
- Balança de precisão
- Agarose
- Tampão TBE
- Marcador de peso molecular
- Azul de bromofenol
- Brometo de etídio
- Transiluminador ultra-violeta
- Parafilme
- Tesoura
- Forno de microondas
- Máscara de proteção contra raios ultra-violeta

8. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

8.1- Amostragem

- Um frasco contendo 1 mL de suspensão viral (produto intermediário) ou bulk (produto acabado à granel).

8.2- Preparo de Soluções

8.2.1- PBS → preparado pelo Setor de Meios e Soluções (SEMES) do Departamento de Vacinas Virais.

8.2.2- dNTP Mix → misturar em tubo de 1,5 mL, igual volume de cada um dos 4 deoxiribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), na concentração inicial de 10 mM, de forma que a concentração final da mistura seja 10mM.

8.2.3- Solução de Oligonucleotídeos (solução estoque) → Os oligonucleotídeos senso e anti-senso são recebidos liofilizados em diferentes concentrações. Observar o número de moles (massa), descrita no certificado do fabricante e ressuspender em água Milli-Q livre de nucleases de modo que a concentração da solução estoque seja de 1nmol/μL. Diluir para uso (solução de trabalho) 1:100, de forma que a solução de trabalho tenha 10 pmoles/μL. Desta forma, fazemos alíquotas e minimizamos o contato com a solução estoque, dificultando a degradação assim como a contaminação da mesma, uma vez que a solução de trabalho nada mais é do que uma diluição da solução estoque. Alternativamente, os oligonucleotídeos podem ser ressuspensos em tampão TE (tris-EDTA, pH 8,0-8,5). Esta solução-estoque pode então ser diluída em água Milli-Q livre de nucleases.

8.2.4- Tampão TBE 5X → 20 ml de EDTA 0,5 M (pH 8), 54g de Tris base e 27,5 de ácido bórico. Diluir esta solução para uso 1X ou 0,5 X.

8.2.5- Gel de Agarose 1,5% (m/v) → 1,5 g de agarose em 48,5 mL de TBE 1X.

8.2.6- Solução de Brometo de Etídio (solução estoque) → 10 mg/mL em água livre de nucleases.

8.2.7- Tampão de Corrida 6X → 30% (v/v) glicerol em água livre de nucleases, 0,25% (m/v) azul de bromofenol.

8.2.8- Marcador de peso molecular → (Low DNA Mass Ladder, por exemplo, ou outro disponível no laboratório.) preparar de acordo com as instruções do fabricante, diluindo em tampão de corrida 6X caso necessário.

8.2.9.- Proteinase K (solução estoque) → Proteinase K em água Milli-Q livre de nucleases; 20 mg/mL. A partir desta, preparar a solução de trabalho Proteinase K em PBS → Proteinase K em PBS para concentração final de 0,2 mg/mL.

8.3- Procedimento

8.3.1 - Extração de DNA total

- Ajustar o bloco térmico para 100°C e preparar um isopor contendo gelo com espaço suficiente para todas as amostras testadas antes de iniciar o procedimento de extração de DNA.

Nota: Concomitantemente à extração de DNA total das amostras, inserir um controle positivo contendo 500 µL de cultura pura de micoplasma. Este controle positivo da extração de DNA total, deve ser cautelosamente manipulado a fim de evitar contaminação acidental das amostras testadas. Deve ser aliquotado previamente e estocado a -20°C.

- Utilizando-se luvas, transferir 1 mL da amostra (suspensão viral ou bulk) para os tubos de 1,5 mL, utilizando micropipetas e ponteiras. Centrifugar em microcentrífuga por 10 minutos a 16000 g.

- Retirar o sobrenadante com auxílio de micropipetas pelo lado oposto da formação do precipitado para não perturbar o mesmo.

- Ressuspender o precipitado com 500 µL de solução de Proteinase K em PBS (solução de trabalho).

- Incubar em banho-maria a 37°C durante 90 minutos.

- Centrifugar em microcentrífuga por 10 minutos a 16000 g. Retirar o sobrenadante com auxílio de pipetas automáticas pelo lado oposto da formação do precipitado para não tocar no sobrenadante. Adicionar 100µL de PBS, homogeneizar e centrifugar a 16000 g por 10 minutos. Repetir esse procedimento perfazendo um total de duas lavagens.

- Retirar o sobrenadante sem tocar no precipitado e adicionar 30µL de PBS, ressuspender utilizando a pipeta automática, homogeneizando todo o conteúdo do tubo.

- Ferver por 10 minutos os tubos em bloco térmico com temperatura de 100°C.

- Resfriar, mergulhando os tubos no gelo por 5 minutos.

- Centrifugar a 16000 g durante 10 minutos.

- Colher o sobrenadante (sem tocar no precipitado) e transferir para um novo tubo de 1,5 mL, uma vez que o sobrenadante contém o DNA de interesse, liberado devido à lise celular.

- Mantenha gelado até o momento de uso.

- Caso não seja utilizado imediatamente após a extração, estocar a -20°C.

8.3.2- Amplificação por PCR

- Antes de iniciar o procedimento as soluções $MgCl_2$, tampão de PCR 10X e os dNTPs devem ser descongeladas à temperatura ambiente e misturados para assegurar a completa homogeneização. Pode-se centrifugar (spin) para assegurar que não ficou na tampa.

- Os reagentes devem ser mantidos no gelo a fim de que não ocorra a degradação dos mesmos.

- A enzima utilizada neste procedimento é termolábil e sensível à oxidação, devendo ser manipulada com rapidez e permanecer gelada durante toda a manipulação, devendo ser armazenada à $-20^{\circ}C$ assim que terminar o procedimento;

-Os quatro diferentes desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) são misturados em iguais concentrações formando uma solução de dNTP Mix, como mostrado abaixo:

Reagente	Volume	Concentração Final
dATP 10 mM	25 μ L	2,5 mM
dCTP 10 mM	25 μ L	2,5 mM
dGTP 10 mM	25 μ L	2,5 mM
dTTP 10 mM	25 μ L	2,5 mM
dNTP Mix (mistura de dATP, dCTP, dGTP e dTTP)	100 μ L	10 mM

- No caso dos oligonucleotídeos para detecção de *Mycoplasma sp.*, estes são utilizados numa concentração de 10 pmoles/ μ L (solução de trabalho), preparado conforme o item 8.2.3.

- Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para detecção de micoplasmas:

Oligonucleotídeos	Seqüência
Iniciador Senso: GPO-1	5' actcctacgggaggcagcagta 3'
Iniciador Anti-Senso: MGSO	5' tgcaccatctgtcactctgttaacctc 3'

- Estes oligonucleotídeos amplificam seqüências de RNA ribossomal 16S de *Mycoplasma sp.*

- Em um tubo de 0,2 mL de parede fina, prepare a seguinte mistura de reação para PCR:

Reagentes	Quantidade	Concentração Final em 50µL
H ₂ O Milli-Q livre de nucleases	24 µl	-
Solução tampão da reação de PCR 10X	5 µl	1X
MgCl ₂ 25mM	4 µl	2 mM
Mistura de dNTP's 10mM	5 µl	1 mM
Oligonucleotídeo senso (GPO-3) 10 pmoles/µL	3 µl	0,6 pmoles/µL
Oligonucleotídeo anti-senso (MGSO) 10 pmoles/µL	3 µl	0,6 pmoles/µL
Taq DNA polimerase 1UI/µL	1 µl	1 UI
TOTAL	45µl	-

-Alternativamente pode-se reduzir o volume final para 25µL, desde que as proporções entre os reagentes sejam mantidas.

- Adicione 5 µL de DNA molde extraído por fervura dentro dos tubos onde foi colocada previamente a mistura de reação (45 µL). Ou 2,5 de DNA e 22,5µL da mistura se optar por fazer num volume final de 25µL.

- Se estiver preparando várias reações, pode-se fazer uma mistura de reação multiplicando cada um dos reagentes pelo número de reações que você irá executar. Depois adicione uma alíquota de 45µL (ou 22,5µL se tiver optado por reduzir o volume final) em cada tubo. É recomendável que se calcule o número de reações mais um acréscimo. Exemplo: Se for realizar o ensaio para 4 amostras, 1 controle positivo (DNA de *Mycoplasma sp.* previamente extraído) e 1 controle negativo (água Milli-Q livre de nucleases), multiplique por 6,5.

- Transfira os tubos para o termociclador e inicie a incubação.

- O programa utilizado para amplificar os fragmentos de DNA por PCR, varia de acordo com o tamanho do fragmento a ser amplificado e oligonucleotídeos utilizados. No caso da amplificação para detecção de micoplasmas, utilizando os oligonucleotídeos GPO-1 e MGSO, deve ser utilizado o seguinte programa no termociclador:

Temperatura	Tempo	Número de ciclos	Objetivos e Notas
94°C	4 min	1	desnaturação inicial
94°C	30 s	35	desnaturação, anelamento e extensão
63°C	30 s		
72°C	90 s		
72°C	10 min	1	extensão e complementação

Notas: a) A mistura de reação sem a enzima Taq polimerase pode ser guardada a -20°C. Adicione a enzima sempre momentos antes da reação de PCR ser iniciada. Esta enzima não deve sofrer ciclos de congelamento e descongelamento pelo risco de perda da sua atividade, ela deve permanecer no gelo ou em bloco apropriado durante toda a manipulação;

b) Um controle negativo deve ser sempre incluído no procedimento, utilize a mesma mistura de reação, porém ao invés de DNA molde utilize água livre de nucleases;

c) Um controle positivo deve ser sempre incluído no procedimento utilize a mesma mistura de reação, porém ao invés de DNA molde utilize um DNA previamente extraído e sabidamente positivo. No entanto, devido à alta sensibilidade da técnica de PCR devemos manusear cuidadosamente este controle a fim de não contaminar as outras reações.

8.4- Análise dos Resultados

8.4.1- Eletroforese em gel de agarose e visualização em transiluminador

- Preparar o tampão TBE 0,5X diluindo a solução de TBE 5X em água Milli-Q livre de nucleases. Dependendo da quantidade de amostras a serem analisadas, calcular o tamanho da cuba de eletroforese utilizada, assim como o volume de TBE 0,5X suficiente para proceder a eletroforese.

- Preparar o gel 1,5% (m/v) em agarose e TBE 0,5X, mais uma vez observar o tamanho da cuba de eletroforese. Esta solução deve ser fundida em forno de microondas a fim de homogeneizar a mistura. A solução do gel de agarose deve ser pesada antes e depois de ir para o microondas, caso ocorra diminuição do volume, este deve ser corrigido com água.

- Dispensar o gel fundido, temperatura entre 50 e 60°C, na forma e colocar o pente para formação das canaletas onde será aplicado o produto do PCR. Esperar solidificar, por aproximadamente 15 minutos.

- A carga do DNA é negativa, assim deve ser observado o sentido de migração das moléculas. Portanto as canaletas, marcadas na agarose pelo pente, onde as amostras serão aplicadas, devem ficar próximas ao anodo (pólo negativo), uma vez que o DNA irá migrar para o catodo (pólo positivo).

- Cobrir o gel com tampão TBE 0,5X.

- Cortar um pedaço de parafilme e com auxílio de pipetas automáticas dispensar 2 µL de tampão de corrida 6X sobre o parafilme. Adicionar 10 µL do produto de PCR, ao tampão de corrida e misturar.

- Aplicar os 12 μ L da mistura em uma canaleta do gel. Não é necessário inserir a pipeta na canaleta apenas aproxime, mergulhando no tampão TBE), pois a mistura é mais densa do que o tampão TBE 0,5X. Não deixar a mistura cair para fora da canaleta. Se o volume final de reação for 25 μ L, pode-se aplicar 5 μ L do tampão de corrida diretamente no tubo e pipetar 12 μ L na canaleta do gel.
- Cada amostra deve ser aplicada em uma canaleta diferente. Assim como os controles positivos e negativo de reação.
- Aplicar o padrão de peso molecular, de acordo com as instruções do fabricante, para comparar o tamanho dos fragmentos amplificados pela reação de PCR.
- Colocar a tampa da cuba de eletroforese e ligar os eletrodos na fonte.
- Regular a voltagem na fonte de eletroforese, de modo a utilizar de 5-6 V/cm. Numa cuba de 7 x 7cm, por exemplo, a corrida deve ser realizada durante aproximadamente 40 min.
- Iniciar a corrida.
- Preparar a solução de uso de brometo de etídio, na concentração de 0,5 μ g/mL.
- Ao final da corrida submergir o gel em solução de brometo de etídio por 15 minutos.
- Colocar o gel sobre o transiluminador e com o ambiente escuro ligar a lâmpada ultravioleta. Equipamentos de segurança devem ser usados como luvas descartáveis e máscaras de proteção.

8.4.2- Interpretação de resultados

- Os fragmentos amplificados pela reação de PCR apresentam aproximadamente 700 pb. Portanto a banda do controle positivo, observada no transiluminador, deve apresentar este tamanho. Comparar os tamanhos das bandas com o padrão de peso molecular.
- Se ao final da eletroforese, não houver o aparecimento de banda específica (~700pb), na canaleta onde a amostra foi aplicada. A amostra é considerada satisfatória (negativo = aprovado).
- Se ocorrer o aparecimento de banda na canaleta onde a amostra foi aplicada, realizar um reteste com novas amostras.
- O reteste deve ser feito de maneira idêntica ao teste inicial. Se não houver aparecimento de banda específica, a amostra é considerada satisfatória.
- Se houver aparecimento de banda de 700 pb no gel de agarose, a amostra é considerada insatisfatória (positivo = reprovado).

Nota: O teste deve ser invalidado se não forem detectadas bandas de 700 pb em ambos os controles positivos (extração e PCR), ou pelo aparecimento de banda semelhante no controle negativo.

9. RELAÇÃO DE CÓPIAS DISTRIBUÍDAS

102200 - DEQUA, 102210 – LACOM, 102220 – LAFIQ.

10. FOLHA DE APROVAÇÃO