

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

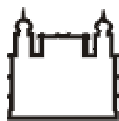
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**DETECÇÃO DE *MYCOPLASMA SP.* E *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* EM
IMUNOBIOLOGICOS E INSUMOS DE PROCESSOS POR PCR EM
TEMPO REAL**

NATÁLIA PEDRA GONÇALVES

RIO DE JANEIRO

2015



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

NATÁLIA PEDRA GONÇALVES

**Detecção de *Mycoplasma* sp. e *Acholeplasma laidlawii* em imunobiológicos e
insumos de processos por PCR em tempo real**

Dissertação apresentada no Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos.

RIO DE JANEIRO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Seção de Gestão de Documentos e Arquivos / SIGDA
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ – RJ

G635

Gonçalves, Natália Pedra.

Detecção de *Mycoplasma sp.* e *Acholeplasma laidlawii* em
imunobiológicos e insumos de processos por PCR em tempo real. /
Natália Pedra Gonçalves. – Rio de Janeiro, 2015.
xxii, 163 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos,
2015.

Bibliografia: f. 149-163

1. Mycoplasma. 2. qPCR. 3. Controle de Qualidade. I. Título.

CDD 589.9

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Departamento de Controle de Qualidade – DEQUA, sob a Orientação dos doutores Daniel da Silva Guedes Júnior e Jaline Coutinho Silvério.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

NATÁLIA PEDRA GONÇALVES

DETECÇÃO DE *MYCOPLASMA SP.* E *ACHOLEPLASMA LAIDLAWII* EM
IMUNOBIOLOGICOS E INSUMOS DE PROCESSOS POR PCR EM TEMPO
REAL

Orientadores: Dr. Daniel da Silva Guedes Júnior e Dra. Jaline Coutinho Silvério

Dissertação: 31 de julho de 2015.

Examinadores:

Dr. Pedro Augusto Alves

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Fiocruz)

Dr. Huarrisson Azevedo Santos

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFFRJ)

Dr. Marcus Sandes Pires

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFFRJ)

RIO DE JANEIRO

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida e bênçãos distribuídas ao longo dos anos, pela proteção e iluminação dos meus caminhos.

À Fundação Oswaldo Cruz e à Bio-Manguinhos pela oportunidade.

À minha família, em especial minha mãe Fátima Maria Pedra, meus pais Nelson Augusto Gonçalves e Silvério Luís Franco, ao meu irmão Hugo Pedra Gonçalves, à Maria Cecília Mesquita, pelo amor e apoio incondicional, nos momentos mais felizes e mais difíceis da minha vida.

Aos meus orientadores Dr. Daniel da Silva Guedes Júnior e Dra. Jaline Coutinho Silvério pelo companherismo, disponibilidade, amizade, apoio e seriedade com que me orientaram ao longo deste trabalho.

Às minhas amigas Nathália Lobo Rodrigues, Mariana Lessa Sucupira, Carolina Padilha Tavares, que me acompanham há tanto tempo com amizade e cumplicidade e que alegam meus dias.

Ao Alexandre Borges Murad, pela amizade desde o primeiro dia de aula, pelo apoio em todos os momentos, pelas risadas e pelo amor construído que me faz uma pessoa mais feliz.

Ao Dr. Pedro Augusto Alves, pela amizade e enorme contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À Mariana Nogueira da Silva Teixeira, pela amizade e cumplicidade construída, dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Alessandra Paes, Beatriz Cyranka, Joyce Brito, Leonardo do Amaral, Érica Louro da Fonseca, Marisa de Oliveira, pela amizade e ótimo ambiente de trabalho.

Ao LATER, em especial à Cristiane Pinheiro, que me auxiliou incansavelmente durante parte do desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de Mestrado, em especial à Priscila Martins, pela amizade, companherismo, horas de almoço e conversas.

Ao Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos, em especial à Darcy Akemi Hokama, que me direcionou e me apoiou junto aos meus orientadores para o desenvolvimento deste trabalho.

À coordenação e secretaria do MPTI, Dra. Sheila Farage por lutar pelos seus alunos, e à Zaíra pelo carinho e atenção prestados.

À FIOTEC pela bolsa de mestrado.

“Enquanto houver vontade de lutar haverá esperança de vencer.”
—Santo Agostinho

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Apresentação.....	1
1.2- A Vacina de Febre Amarela.....	2
1.3- A Vacina de Sarampo, Caxumba e Rubéola.....	3
1.4- A Garantia da Qualidade.....	7
1.4.1- Departamento de Controle de Qualidade.....	7
1.4.2- Caracterização dos microrganismos da classe <i>Mollicutes</i> - A importância da pesquisa de <i>Mycoplasma sp.</i> e <i>A. laidlawii</i>	8
1.4.3- Pesquisa de <i>Mycoplasma sp.</i> e <i>A. laidlawii</i> segundo a Farmacopeia Europeia 7.0.....	10
1.5- Técnicas de amplificação de DNA.....	11
1.5.1- A técnica de qPCR.....	13
1.5.1.1- Sistemas de detecção.....	15
1.5.1.2- Prospecção dos iniciadores.....	17
1.5.1.3- Parâmetros da qPCR.....	18
1.5.1.3.1- <i>Threshold</i>	18
1.5.1.3.2- <i>Cycle Threshold</i> (C_q).....	19
1.5.1.3.3- Curva de dissociação.....	19
1.5.1.3.4- Eficiência (E).....	20
1.5.1.3.5- Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD).....	22
1.5.1.3.5.1- Curva-padrão.....	23
1.5.1.3.5.2- Coeficiente de correlação (R^2).....	23
1.5.1.3.5.3- Interseção do eixo y.....	23
1.6 - Detecção de <i>Mycoplasma sp.</i> e <i>A. laidlawii</i> em Bio-Manguinhos.....	24

2- OBJETIVOS.....	26
2.1- Objetivo Geral.....	26
2.2- Objetivos Específicos.....	26
3- METODOLOGIA.....	28
3.1- Seleção dos microrganismos.....	28
3.2- Extração de DNA.....	28
3.3- Prospecção dos iniciadores.....	29
3.4- Reconstituição dos iniciadores.....	30
3.5- Reações de qPCR.....	30
3.5.1- Otimização de concentração de iniciadores.....	32
3.5.2- Ensaios de especificidade.....	33
3.5.2.1- Análise <i>in silico</i>	33
3.5.2.2- Ensaios <i>in vitro</i>	33
3.5.2.2.1- Ensaios com <i>M. orale</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. pneumoniae</i>	33
3.5.2.2.2- Ensaios com <i>A. laidlawii</i>	34
3.5.2.2.3- Ensaios de exclusividade.....	35
3.5.3- Ensaios de Limite de Detecção (LD).....	36
3.5.3.1- Obtenção dos controles positivos.....	36
3.5.3.2- Desenho experimental dos ensaios de LD.....	38
3.5.4- Comparação de desempenho do protocolo de qPCR <i>in house</i> com o do kit <i>Mycoseq</i> [®] (Life Technologies [®]) e PCR multiplex convencional.....	39
3.5.5- Avaliação de interferência de matriz.....	40
3.5.5.1- Vacina de Febre Amarela.....	40
3.5.5.2- Soro fetal bovino.....	42
3.6- Análise estatística.....	43
4.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1- Prospecção dos iniciadores.....	44
4.2- Inclusão de espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. detectadas pelos iniciadores.....	58
4.3- Otimização das reações de qPCR <i>in house</i>	61

4.3.1- Otimização do par F3R3.....	61
4.3.2- Otimização do par F1R1.....	65
4.3.3- Otimização do par F2R2 e MPF3/R3.....	67
4.4- Especificidade.....	69
4.4.1- Ensaio com as bactérias do gênero <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i> e <i>Lactobacillus</i> sp....	69
4.4.1.1- Ensaio com os iniciadores do grupo 1 (<i>M. orale</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. fermentans</i> , <i>M. arginini</i> e <i>M. hyorhinis</i>).....	70
4.4.1.2- Ensaio com os iniciadores do grupo 2M (<i>M. gallisepticum</i>).....	72
4.4.1.3- Ensaio com os iniciadores do grupo 2P (<i>M. pneumoniae</i>).....	74
4.4.1.4- Ensaio com os iniciadores do grupo 3 (<i>A. laidlawii</i>).....	76
4.4.1.5- Ensaio multiplex para a escolha dos iniciadores de <i>A. laidlawii</i>	88
4.4.2- Ensaio de exclusividade entre os iniciadores e micoplasmas.....	90
4.4.2.1- Ensaio com F1R1.....	90
4.4.2.2- Ensaio com F2R2.....	93
4.4.2.3- Ensaio com MPF3/R3.....	95
4.4.2.4- Ensaio com F3R3.....	97
4.5- LD da qPCR <i>in house</i>	99
4.5.1- Obtenção dos controles positivos.....	99
4.5.2- Ensaio de LD.....	105
4.5.2.1- Ensaio com os iniciadores do grupo 1, 2M, 2P e 3.....	105
4.5.2.2- Considerações acerca do LD.....	108
4.6- Comparação do desempenho da qPCR <i>in house</i> com o kit <i>Mycoseq</i> [®] (Life Technologies [®]) e a PCR convencional multiplex	109
4.6.1- Ensaio <i>in vitro</i> da detecção de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i>	109
4.6.2- Outras vantagens da qPCR <i>in house</i>	120
4.7- Avaliação da interferência de matriz.....	121
4.7.1- Suspensão viral de vacina de Febre Amarela.....	121
4.7.1.1- Ensaio com os de iniciadores F3R3 utilizando <i>pellet</i> de suspensão viral.....	121
4.7.1.2- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando sobrenadante de suspensão viral.....	123

4.7.1.3- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando <i>pellet</i> e sobrenadante de suspensão viral extraídos com o kit <i>Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System (Promega[®])</i>	125
4.7.1.4- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando matriz total de suspensão viral.....	128
4.7.1.5- Ensaio com os iniciadores F1R1 utilizando <i>pellet</i> de suspensão viral.....	132
4.7.2- PAG de Vacina de Febre Amarela.....	135
4.7.2.1- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando <i>pellet</i> de PAG.....	135
4.7.2.2- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando sobrenadante de PAG.....	137
4.7.2.3- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando <i>pellet</i> e sobrenadante de PAG extraídos com kit <i>Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System (Promega[®])</i>	138
4.7.2.4- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando matriz total de PAG.....	141
4.7.3- Soro Fetal Bovino.....	144
5- CONCLUSÃO.....	147
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC- American Type Culture Collection

ANVISA- Agência de Vigilância sanitária

BPF- Boas Práticas de Fabricação

CBV- Calendário básico de vacinação

CEF – Fibroblastos de embrião de galinha inglês

C_q- do inglês "*Cycle threshold*"

CQ- Controle de Qualidade

DEQUA- Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos

ELISA- do inglês "*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*"

FA- Febre Amarela

FDA- Food and Drug Administration

FE- Farmacopeia Europeia

GQ- Garantia da Qualidade

IgM-Imunoglobulina do tipo M

IgG- Imunoglobulina do tipo G

LATER- Laboratório de Tecnologia do DNA recombinante

LD- Limite de detecção

MIF- Mulheres em idade fértil

NAT- Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos – do inglês "*Nucleic Acid Amplification Techniques*"

NCTC- *National Collection of Type Cultures*

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAG- Produto acabado a granel

PAC- preparo após clarificação do inglês “*pool after clarification*”

PNI- Programa Nacional de Imunização

R^2 - coeficiente de correlação

RNA- Ácido ribonucleico do inglês “*ribonucleic acid*”

SETBI- Seção de Testes Biomoleculares e Imunocitoquímica

SEPIN- Seção de Esterilidade, Processamento e Insumos

SPF- Livre de patógenos específicos do inglês “*Specific Pathogens Free*”

T_m- do inglês “*Melting temperature*”

TVV- Vacina tríplice viral

UFC- Unidades formadoras de colônia

VFA- Vacina de febre amarela

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenças entre as técnicas de cultivo, indicador de cultura, PCR convencional e qPCR.....	13
Tabela 3.1: Composição das soluções de trabalho dos iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR com o protocolo <i>in house</i>	30
Tabela 3.2: Perfil de amplificação adotado para as reações de qPCR com o protocolo <i>in house</i> e com o kit <i>Mycoseq</i> [®]	31
Tabela 3.3: Composição das reações do protocolo <i>in house</i>	31
Tabela 3.4: Composição do premix utilizado nas reações do kit <i>Mycoseq</i> [®] (Life Technologies [®]).....	31
Tabela 3.5: Composição das reações do kit <i>Mycoseq</i> [®] (Life Technologies [®]).....	32
Tabela 3.6: Composição das reações de PCR para clonagem.....	37
Tabela 3.7: Interpretação dos resultados aplicado aos ensaios com o kit <i>Mycoseq</i> [®] (Life Technologies [®]).....	40
Tabela 4.1: Descrição dos grupos de microrganismos quanto às espécies detectadas, seus iniciadores e o tamanho do fragmento amplificado correspondente.....	54
Tabela 4.2: Caracterização dos iniciadores quanto ao percentual de bases CG e à previsão de T_m , formação de alças e homodímeros (Integrated DNA Technologies [®]).....	55
Tabela 4.3: Formação de heterodímeros entre os iniciadores prospectados (Integrated DNA Technologies [®]).....	56
Tabela 4.4: Espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i> detectadas <i>in silico</i> por cada um dos conjuntos de iniciadores desenhados.....	60
Tabela 4.5: Valores de C_q e T_m das reações de otimização dos iniciadores senso e anti-senso F3 e R3 com 200 nM, 400 nM, 600 nM e 800 nM.....	62
Tabela 4.6: Valores de C_q e T_m das reações de otimização dos iniciadores senso e anti-senso F3 e R3 com 800 nM e 1 μ M	65
Tabela 4.7: Valores de C_q e T_m das reações de otimização dos iniciadores senso e anti-senso F1 e R1 com 800 nM e 1 μ M.....	66

Tabela 4.8: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de 25 UFC de <i>M. pneumoniae</i> utilizando os iniciadores F2R2 e MPF3/R3.....	68
Tabela 4.9: Teste de especificidade de F1R1.....	72
Tabela 4.10: Teste de especificidade de F2R2.....	74
Tabela 4.11: Teste de especificidade de MPF3/R3.....	75
Tabela 4.12: Teste de especificidade de F3R3.....	77
Tabela 4.13: Teste de especificidade de F3R4.	80
Tabela 4.14: Teste de especificidade de F3R5.	82
Tabela 4.15: Teste de especificidade de F4R3.....	84
Tabela 4.16: Teste de especificidade de F4R4.....	85
Tabela 4.17: Teste de especificidade de F4R5.....	86
Tabela 4.18: Resultados obtidos nos ensaios de especificidade com os seis conjuntos de iniciadores prospectados para detecção de <i>A. laidlawii</i> por qPCR.....	88
Tabela 4.19: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de especificidade multiplex com os iniciadores do grupo 1 (F1R1), grupo 2M (F2R2) e grupo 3 (F3R3 e F3R4).....	90
Tabela 4.20: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de F1R1 com 25 UFC de <i>M. synoviae</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. pneumoniae</i> , <i>A. laidlawii</i> , <i>pool</i> formado com estas espécies e <i>M. orale</i> (totalizando 25 UFC).....	92
Tabela 4.21: Percentual de similaridade entre os iniciadores do par F1R1 e outras espécies de micoplasma preconizadas pela FE 7.0 (BLASTn [®] -NCBI [©]).....	92
Tabela 4.22: Percentual de similaridade entre os iniciadores do par F2R2 e outras espécies de micoplasma preconizadas pela FE 7.0 (BLASTn [®] -NCBI [©]).....	94
Tabela 4.23: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de F2R2 com 25 UFC de <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. synoviae</i> e <i>A. laidlawii</i> testados individualmente ou em <i>pool</i>	94

Tabela 4.24: Percentual de similaridade entre os iniciadores do par MPF3/R3 e outras espécies de micoplasma preconizadas pela FE 7.0 (BLASTn [®] -NCBI [®]).....	95
Tabela 4.25: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de MPF3/R3 com 25 UFC de <i>M. pneumoniae</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>A. laidlawii</i> testados isoladamente e em <i>pool</i>	96
Tabela 4.26: Percentual de similaridade de acordo com BLASTn [®] (NCBI [®]) entre os iniciadores do par F3R3 e outras espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. preconizadas pela FE 7.0.....	97
Tabela 4.27: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de F3R3 com 25 UFC de <i>A. laidlawii</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. gallisepticum</i> e <i>M. pneumoniae</i> , testados isoladamente e em <i>pool</i>	98
Tabela 4.28: Quantificação após purificação dos produtos de PCR convencional selecionados para cada <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i> por fluorimetria.....	100
Tabela 4.29: Quantificação dos plasmídeos após extração.....	101
Tabela 4.30: Quantificação dos plasmídeos após digestão com a enzima <i>NcoI</i> (Promega [®])...	104
Tabela 4.31: Valores da T_m calculados por microrganismo.....	106
Tabela 4.32: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de <i>M. orale</i> por qPCR com o protocolo <i>in house</i> e com o kit <i>MycoSEQ</i> [®] (Life Technologies [®]).....	110
Tabela 4.33: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de <i>M. synoviae</i> por qPCR com o protocolo <i>in house</i> e com o kit <i>MycoSEQ</i> [®] (Life Technologies [®]).....	112
Tabela 4.34: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de <i>M. gallisepticum</i> por qPCR com o protocolo <i>in house</i> e com o kit <i>MycoSEQ</i> [®] (Life Technologies [®]).....	114
Tabela 4.35: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de <i>M. pneumoniae</i> por qPCR com o protocolo <i>in house</i> e com o kit <i>MycoSEQ</i> [®] (Life Technologies [®]).....	116
Tabela 4.36: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de <i>A. laidlawii</i> por qPCR com o protocolo <i>in house</i> e com o kit <i>MycoSEQ</i> [®] (Life Technologies [®]).....	119
Tabela 4.37: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com os iniciadores F3R3 utilizando <i>pellet</i> extraído de: suspensão viral livre de micoplasmas, suspensão viral aditada com <i>A. laidlawii</i> e de <i>pellet</i> de cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	122
Tabela 4.38: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com sobrenadante extraído de: suspensão viral livre de micoplasmas, suspensão viral aditada com <i>A. laidlawii</i> e de cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	124
Tabela 4.39: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com sobrenadante e <i>pellet</i> extraído de suspensão viral livre de micoplasmas, suspensão viral aditada com <i>A. laidlawii</i> e de cultura pura de <i>A. laidlawii</i> com o kit <i>Wizard</i> [®] <i>SV Genomic DNA Purification System</i> (Promega [®]).....	126

Tabela 4.40: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com DNA extraído de 500 -100 μ L de matriz total de suspensão viral aditada com 10 UFC de <i>A. laidlawii</i> e de suspensão viral livre de micoplasmas.....	130
Tabela 4.41: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com DNA correspondente a 10 UFC extraído de cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	130
Tabela 4.42: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com DNA extraído de 500, 200 e 100 μ L de: matriz total de suspensão viral aditada com 10 UFC de <i>A. laidlawii</i> e de suspensão viral livre de micoplasmas, e DNA extraído de 10 UFC de cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	131
Tabela 4.43: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com DNA extraído de suspensão viral livre de micoplasmas, de <i>pellet</i> de suspensão viral aditada com <i>M. orale</i> , e DNA extraído de cultura pura de <i>M. orale</i>	133
Tabela 4.44: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com <i>pellet</i> extraído de: PAG livre de micoplasmas, PAG aditado com <i>A. laidlawii</i> e de cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	135
Tabela 4.45: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com sobrenadante extraído de: PAG livre de micoplasmas, PAG aditado com <i>A. laidlawii</i> e de cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	138
Tabela 4.46: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com sobrenadante e <i>pellet</i> extraídos de PAG livre de micoplasmas, PAG aditada com <i>A. laidlawii</i> e de cultura pura de <i>A. laidlawii</i> com o kit Wizzard [®] SV Genomic DNA Purification System (Promega [®]).....	140
Tabela 4.47: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com DNA extraído de 500 -100 μ L de: matriz total de PAG aditada com 10 UFC de <i>A. laidlawii</i> e de PAG livre de micoplasmas.....	142
Tabela 4.48: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com DNA extraído de 10 UFC de <i>A. laidlawii</i>	142
Tabela 4.49: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com DNA extraído de 500, 200 e 100 μ L de: matriz total de PAG aditada com 2 UFC de <i>A. laidlawii</i> , de PAG livre de micoplasmas e de cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	143
Tabela 4.50: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR <i>in house</i> com DNA extraído de <i>pellet</i> de cultura pura de <i>A. laidlawii</i> , de soro fetal bovino contaminado e de soro fetal bovino livre de micoplasmas.....	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Estratégias de Controle de 1980 a 2013* contra o Sarampo com a Incidência dos casos e Cobertura Vacinal.....	4
Figura 1.2: Coeficiente de mortalidade e letalidade por sarampo no Brasil entre 1997 - 2000.....	5
Figura 1.3: Evolução da taxa de incidência de rubéola e estratégias de controle.....	6
Figura 1.4: Cultivo em ágar de colônia com aspecto de ovo estrelado característica de micoplasmas.....	9
Figura 1.5: Amplificação de DNA alvo por PCR convencional.....	12
Figura 1.6: Filtros do sistema óptico de um aparelho de qPCR.....	14
Figura 1.7: Gráfico de amplificação de qPCR representado por uma curva de qPCR linear de amostras diluídas com fator 10.....	15
Figura 1.8: Amplificação por qPCR com sondas de hidrólise TaqMan [®]	16
Figura 1.9: Amplificação por qPCR utilizando sistema SYBR [®] Green.....	17
Figura 1.10: Caracterização das etapas de amplificação de uma amostra por qPCR no plot de amplificação em escala linear.....	19
Figura 1.11: Caracterização dos produtos de qPCR através da análise do T_m	21
Figura 1.12: Avaliação da eficiência da qPCR utilizando diluições seriadas de uma amostra.....	21
Figura 1.13: Demonstrativo de uma curva padrão de amplificação.....	24
Figura 3.1: Modelo de reação para otimização de concentração dos iniciadores das reações de qPCR <i>in house</i> utilizando 25, 5 e 0,5 UFC de um microrganismo alvo.....	32
Figura 3.2: Ensaio de qPCR para avaliação de especificidade de <i>M. orale</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. pneumoniae</i>	34

Figura 3.3: Ensaio preliminar de qPCR para avaliação de especificidade dos iniciadores para a detecção de <i>A. laidlawii</i>	34
Figura 3.4: Ensaio multiplex para a escolha dos iniciadores para a detecção de <i>A. laidlawii</i> por qPCR <i>in house</i>	35
Figura 3.5: Modelo de ensaio de qPCR <i>in house</i> para avaliação de reação cruzada entre dois conjuntos de iniciadores do protocolo <i>in house</i> e cinco espécies de micoplasmas.....	36
Figura 3.6: Fórmula para cálculo da massa do inserto para realizar a clonagem.....	37
Figura 3.7: Fórmula para cálculo do número de cópias de DNA/ μ L obtidas após a clonagem.....	38
Figura 3.8: Ensaio de LD com <i>M. arginini</i> utilizando DNA plasmidial.....	39
Figura 3.9: Ensaio de qPCR <i>in house</i> e com o kit <i>Mycoseq</i> [®] (Life Technologies [®]) de 25, 10, 2 e 0,4 UFC de <i>M. orale</i>	40
Figura 3.10: Desenho experimental do ensaio para estudo de interferência de matriz.....	41
Figura 3.11: Modelo de placa para ensaio de qPCR em triplicata para avaliação de interferência de matriz total ou das frações (sobrenadante e <i>pellet</i>) de suspensão viral ou PAG.....	42
Figura 3.12: Avaliação da interferência do <i>pellet</i> de soro fetal bovino na detecção de <i>A. laidlawii</i> por qPCR <i>in house</i>	43
Figura 4.1: Alinhamento da região 16SrDNA (parcial) das sete espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i> com fragmento de 203 pb.....	45
Figura 4.2: Alinhamento da região 16SrDNA (parcial) das sete espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i> com fragmento de 203 pb.....	46
Figura 4.3: Alinhamento (das sequências parciais) da região 16S rDNA das sete espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i>	47
Figura 4.4: Alinhamento (das sequências parciais) da região 16S rDNA das sete espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i>	48
Figura 4.5: Alinhamento da região 16S rDNA (parcial) das sete espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i> com <i>S. pyogenes</i>	49
Figura 4.6: Alinhamento da região 16S rDNA (parcial) das sete espécies de <i>Mycoplasma</i> sp.....	50

Figura 4.7: Árvores filogenéticas detalhadas dos grupos de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i> de acordo com o grau de similaridade.....	51
Figura 4.8: Alinhamento das espécies do grupo 1, 2M, 2P e 3.....	53
Figura 4.9: Análise <i>in silico</i> dos iniciadores F1 e R1.	58
Figura 4.10: Otimização das reações de qPCR <i>in house</i> com os iniciadores F3R3.....	63
Figura 4.11: Ensaio de amplificação de <i>A. laidlawii</i> com o par F3R3 nas concentrações de com 1 µM e 800 nM.....	64
Figura 4.12: Ensaio de otimização dos iniciadores F1R1.....	66
Figura 4.13: Ensaio de otimização com F2R2 e MPF3/R3.....	67
Figura 4.14: Comparação dos iniciadores F2R2 e MPF3/R3 na detecção de <i>M. pneumoniae</i>	68
Figura 4.15: Teste de especificidade do conjunto F1R1.....	71
Figura 4.16: Teste de especificidade do conjunto F2R2.....	73
Figura 4.17: Teste de especificidade do conjunto MPF3/R3.....	76
Figura 4.18: Teste de especificidade com F3R3.....	78
Figura 4.19: Teste de especificidade com F3R4.....	80
Figura 4.20: Teste de especificidade com F3R5.....	81
Figura 4.21: Teste de especificidade com F4R3.....	83
Figura 4.22: Teste de especificidade com F4R4.....	85

Figura 4.23: Teste de especificidade com F4R5.....	87
Figura 4.24: Ensaio de especificidade multiplex para a escolha dos iniciadores de <i>A. laidlawii</i>	89
Figura 4.25: Teste de exclusividade entre os micoplasmas e o par F1R1.....	91
Figura 4.26: Teste de exclusividade de micoplasmas com F2R2.....	93
Figura 4.27: Teste de exclusividade de micoplasmas com MPF3/R3.....	96
Figura 4.28: Teste de exclusividade de micoplasmas com F3R3.....	98
Figura 4.29: Amplificação de DNA de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i> por PCR convencional utilizando os iniciadores prospectados para a qPCR <i>in house</i> (F1R1, F2R2, MPF3/R3 e F3R3).....	100
Figura 4.30: Amplificação da região 16S rDNA de algumas espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i> por PCR convencional utilizando os iniciadores pertencentes ao protocolo de qPCR <i>in house</i>	101
Figura 4.31: Sequenciamento do plasmídeo de <i>M. gallisepticum</i>	102
Figura 4.32: Curva de amplificação de 10^7 a 1 cópia de DNA plasmidial circular de <i>M. orale</i> por qPCR <i>in house</i> com o conjunto F1R1.....	102
Figura 4.33: Mapa do vetor <i>pGEM[®] T-Easy</i> (Promega [®]) e os pontos de referência para corte com as enzimas listadas.....	103
Figura 4.34: Digestão plasmidial com a enzima <i>NcoI</i> (Promega [®]).....	104
Figura 4.35: Ensaio de LD por qPCR <i>in house</i> com os iniciadores do grupo 1.....	107
Figura 4.36: Ensaio de LD por qPCR <i>in house</i> com os iniciadores do grupo 2, 3 e 4.....	108
Figura 4.37: Comparação do desempenho da qPCR <i>in house</i> na detecção de <i>M. orale</i> com o kit <i>MycoSEQ[®]</i> (Life Technologies [®]) e PCR multiplex convencional.....	111
Figura 4.38: Comparação do desempenho da qPCR <i>in house</i> na detecção de <i>M. synoviae</i> com o kit <i>MycoSEQ[®]</i> (Life Technologies [®]) e PCR multiplex convencional.....	113

Figura 4.39: Comparação do desempenho da qPCR <i>in house</i> na detecção de <i>M. gallisepticum</i> com o kit MycoSEQ [®] (Life Technologies [®]) e PCR multiplex convencional..	115
Figura 4.40: Comparação do desempenho da qPCR <i>in house</i> na detecção de <i>M. pneumoniae</i> com o kit MycoSEQ [®] (Life Technologies [®]) e PCR multiplex convencional....	117
Figura 4.41: Comparação do desempenho da qPCR <i>in house</i> na detecção de <i>A. laidlawii</i> com o kit MycoSEQ [®] (Life Technologies [®]) e PCR multiplex convencional.....	118
Figura 4.42: Avaliação da interferência do <i>pellet</i> de suspensão viral contaminado com 2 e 0,2 UFC de <i>A. laidlawii</i> , respectivamente.....	123
Figura 4.43: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com 2 UFC de DNA extraído de sobrenadante de suspensão viral contaminada com <i>A. laidlawii</i>	124
Figura 4.44: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com 2 UFC de DNA extraído de sobrenadante e <i>pellet</i> de suspensão viral contaminada com <i>A. laidlawii</i> com o kit Wizard [®] SV Genomic DNA Purification System (Promega [®]).....	127
Figura 4.45: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com 10 UFC de DNA extraído de matriz total de suspensão viral contaminada com <i>A. laidlawii</i> . A-E: Curvas de dissociação dos volumes de 500, 400, 300, 200 e 100 µL de suspensão viral, aditadas e não aditadas com <i>A. laidlawii</i> , respectivamente.	129
Figura 4.46: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com 2 UFC de DNA extraído de 500, 200 e 100 µL de matriz total de suspensão viral contaminada com <i>A. laidlawii</i>	131
Figura 4.47: Ensaio de interferência de matriz com <i>pellet</i> de suspensão viral aditado com <i>M. orale</i>	134
Figura 4.48: Avaliação da interferência do <i>pellet</i> de PAG contaminado com 2 e 0,2 UFC de <i>A. laidlawii</i> , respectivamente.....	136
Figura 4.49: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com 2 UFC de DNA extraído de sobrenadante de PAG contaminada com <i>A. laidlawii</i>	137
Figura 4.50: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com 2 UFC de DNA extraído de sobrenadante e <i>pellet</i> de PAG contaminado com <i>A. laidlawii</i> através do kit Wizard [®] SV Genomic DNA Purification System (Promega [®]).....	139
Figura 4.51: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com F3R3 utilizando matriz total de PAG, aditada e não contaminada com cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	141
Figura 4.52: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com F3R3 utilizando 2 UFC de DNA extraído de 500, 200 e 100 µL de matriz total de PAG contaminada com <i>A. laidlawii</i>	144
Figura 4.53: Ensaio de qPCR <i>in house</i> com F3R3 utilizando 5 UFC de DNA extraído de <i>pellet</i> de soro fetal bovino contaminado com <i>A. laidlawii</i>	145

RESUMO

O gênero *Mycoplasma* é composto pelos menores procariotos desprovidos de parede celular. Eles estão amplamente distribuídos no ambiente como parasitas humanos, causando pneumonia e doenças urogenitais, ou infectando outros organismos. Além disso, eles frequentemente são encontrados no ambiente industrial contaminando produtos derivados de células biológicas farmacêuticos. A detecção de *Mycoplasma* sp. e *Acholeplasma laidlawii* nos produtos biológicos é um teste de controle de qualidade exigido pela Farmacopeia Europeia (FE) e Brasileira realizado rotineiramente indústrias. Foi proposto o desenvolvimento de um protocolo de qPCR *in house* para a detecção das espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* preconizados pela FE, visando a melhoria da técnica atual utilizada na SETBI aplicada a produtos biológicos e meios de cultura de Bio-Manguinhos. As sequências gênicas do *locus* 16S rDNA das oito espécies de *Mycoplasma* recomendadas pela FE foram obtidas no GenBank[®] e alinhadas pela ferramenta *online* ClustalOmega para a seleção das regiões em comum, excluindo-se aquelas encontradas nos gêneros *Streptococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus*, pois são espécies filogeneticamente próximas a *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*. A avaliação dos parâmetros necessários para o desenho dos oligonucleotídeos utilizou o programa *online* IDT OligoAnalyzer[®] 3.1 e as reações de qPCR foram realizadas utilizando SYBR[®] Green e os iniciadores nas concentrações estabelecidas nos ensaios de otimização. A especificidade dos iniciadores foi avaliada *in silico* - BLASTn[®] (NCBI[®]) - e *in vitro* utilizando DNA extraído de cultura pura de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus*, e de cinco espécies de *Mycoplasma* sp. como controle positivo. O limite de detecção (LD) foi estabelecido a partir de curvas-padrão com oito quantidades de cópias de DNA com diluição de fator 10. O desempenho da qPCR *in house* na detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* foi comparada com a PCR e o kit comercial MycoSEQ[®] (Life Technologies[®]). A avaliação da interferência das matrizes de imunobiológicos e soro fetal bovino na reação de qPCR *in house* foi avaliada utilizando diferentes frações das amostras e dois kits de extração. Foi desenvolvido um protocolo de qPCR *in house* através da prospecção de quatro conjuntos de iniciadores específicos capazes de detectar cerca de 40 espécies de *Mycoplasma* sp., incluindo aquelas preconizadas pela FE, com LD de 1 cópia de DNA para *A. laidlawii* e 10 cópias para as demais espécies. A qPCR *in house* demonstrou melhor desempenho na detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* quando comparada a PCR convencional multiplex utilizada na SETBI e ao kit comercial MycoSEQ[®] (Life Technologies[®]). As matrizes de suspensão viral, PAG de vacina de febre amarela apresentam interferência na detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* reação de qPCR *in house*, sendo os melhores resultados obtidos quando utilizadas as matrizes totais de ambos os produtos. O ensaio preliminar com soro fetal bovino demonstrou a necessidade futura de otimização do processo de extração e/ou de amplificação no intuito de eliminar a interferência desta matriz nas reações de qPCR. O desenvolvimento da metodologia de qPCR *in house*, que demonstrou ser específica e mais sensível do que o atual método aplicado na rotina da SETBI e o kit comercial MycoSEQ[®] (Life Technologies[®]), representa a melhoria dos ensaios de controle de qualidade e a diminuição dos custos para Bio-Manguinhos.

ABSTRACT

Mycoplasma is the smallest less-wall prokaryotic organism and can cause pneumonia and urogenital diseases in humans. Moreover, they frequently contaminate research and commercial laboratories involved in development and production of biological and pharmaceutical cell-derived products, enabling unreliable experimental results and unsafe biological products. The detection of *Mycoplasma* sp. and *Acholeplasma laidlawii* in biological products is a quality control test required by the Brazilian and European Pharmacopoeia (Eur.Ph.) and carried out by industries. To attend the requirements of the regulatory agencies, we proposed to develop an *in house* real time PCR (qPCR) protocol for assessing *Mycoplasma* sp. and *A. laidlawii* in order to improve the current technique used in SETBI applied to biological products and culture media in Bio- Manguinhos. The primer design was realized by using the genome of the 16S ribosomal locus of the eight species required by Eur.Ph. selected in GenBank[®]. These sequences were aligned using the online tool ClustalOmega in order to select a common region for primer design. To achieve the specificity criteria, were excluded the regions shared with other phylogenetic related bacteria as *Streptococcus*, *Clostridium* and *Lactobacillus* genera. The primer design was analyzed through the online tool IDT OligoAnalyzer[®] 3.1 and the qPCR reactions were carried out using SYBR[®] Green and primers at concentrations established in the optimization tests. The specificity of the primers was assessed *in silico* - BLASTn[®] (NCBI[®]) - and *in vitro* using DNA from pure culture of *S. pyogenes*, *C. sporogenes* and *L. acidophilus*, and five species of *Mycoplasma* sp. as a positive control. The detection limit (LD) was established from standard curves with eight amounts of DNA copies with dilution factor of 10. Performance of qPCR *in house* for the detection of *Mycoplasma* sp. and *A. laidlawii* was compared with conventional PCR and the commercial kit MycoSEQ[®] (Life Technologies[®]). The evaluation of interference from biopharmaceuticals products and fetal bovine serum in qPCR *in house* was assessed by using different fractions of the samples and two extraction kits. Four pairs of primers were designed and BLASTn[®] research revealed homology to forty *Mycoplasma* species, including the species required by Eur.Ph. with 94-100% of identity. The qPCR tests using *in house* protocol demonstrated that the primers are specific for *Mycoplasma* genus and *A. laidlawii*, and the detection limit was 1 copie for *A. laidlawii* and 10 for the other species. The qPCR *in house* had superior performance detecting *Mycoplasma* sp. and *A. laidlawii* when compared to conventional PCR multiplex used in SETBI and MycoSEQ[®] (Life Technologies[®]). The tests with viral suspension and PAG from yellow fever vaccine demonstrated the interference in detection of *Mycoplasma* sp. and *A. laidlawii* by qPCR *in house*, and the best results were obtained when using all matrix from both products. The preliminar tests using fetal bovine serum suggest the need for further optimization of the extraction process and/or amplification in order to eliminate the interference of this matrix in qPCR reactions. The development of qPCR methodology *in house*, which proved to be as specific and more sensitive than the current method applied in SETBI and kit commercial MycoSEQ[®] (Life Technologies[®]), represents the improvement of quality control tests and the decrease of costs for Bio- Manguinhos.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Apresentação

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), fundado em 1976, é a unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) responsável pelo desenvolvimento e produção de vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos voltados para atender prioritariamente às demandas da saúde pública nacional.

O Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) do Instituto, um dos maiores e mais modernos centros de produção da América Latina, garante a auto-suficiência em vacinas essenciais para o calendário básico de imunização do Ministério da Saúde (MS), como a vacina contra a poliomielite oral trivalente, vacina tríplice viral contra sarampo, caxumba e rubéola, vacina tetravalente DTP e Hib conjugada, assim como a tradicional vacina contra febre amarela. Dentre os reativos para diagnóstico e biofármacos podem-se destacar o kit NAT HIV/HCV/HBV, utilizado nos hemocentros brasileiros para ampliar a segurança transfusional, e a alfaepoetina fornecida desde 2006 para o tratamento de anemias, respectivamente.

Além de Bio-Manguinhos garantir à população brasileira acesso gratuito a imunobiológicos de alta tecnologia e reduzir dos gastos do Ministério da Saúde, a unidade possui reconhecimento internacional devido, entre outros fatores, ao cumprimento dos requerimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e à certificação de qualidade de seus laboratórios.

Desde 2001, o Instituto é pré-qualificado junto à Organização Mundial da Saúde (OMS) para o fornecimento das vacinas febre amarela e, desde 2008, para a vacina meningocócica AC para agências das Nações Unidas. O excedente de sua produção é exportado para mais de 70 países através da Organização Pan-Americana da Saúde (Opas) e do Fundo das Nações Unidas para a Infância. Em 2014, Bio-Manguinhos foi responsável por 58,82% das vacinas produzidas no Brasil ao entregar 103.636.623 doses de vacinas para

serem usadas pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI). Além disso, foram fornecidos 9.590.777 frascos de biofármacos e 5.839.396 de reativos para diagnóstico para o MS.

1.2- A Vacina de Febre Amarela

A Febre Amarela (FA) é uma doença infecciosa aguda causada pelo *Yellow fever virus* (YFV, vírus da febre amarela) do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, que contém diversos outros vírus potencialmente patogênicos para o homem, como o *Dengue virus*, o *West Nile virus*, o *Rocio virus* e *St. louis encephalitis virus*. Este flavivírus possui um genoma de RNA fita simples não-segmentado, de polaridade positiva com cerca de 11 kilobases (kb) de comprimento, e de acordo com estudos recentes, apresenta 7 genótipos distintos, dentre os quais 5 são da África e 2 das Américas (Wang et al., 1996; Mutebi et al., 2001; Vasconcelos,

Os quadros clínicos da FA podem ser: assintomáticos, leves e moderados, os quais representam a maioria dos casos com sintomatologia inespecífica como febre e dores musculares; e graves, englobando cerca de 5 a 10% dos casos, que se caracterizam com manifestações hepáticas e renais. A importância da doença é devida à letalidade das formas graves, à facilidade de disseminação para áreas urbanas e à dificuldade de diagnóstico, principalmente das formas leves e moderadas, cujos sintomas podem ser confundidos com outras doenças como hepatites e malária.

A susceptibilidade à doença é independente de sexo, faixa etária ou raça, entretanto, a sua incidência se dá, em maior proporção, em adultos do sexo masculino entre 14 a 35 anos, devido à sua maior exposição ao vírus. Dentre os grupos populacionais mais afetados estão os indivíduos não vacinados residentes de regiões endêmicas ou próximas a elas, assim como os ecoturistas (Vasconcelos, 2003).

A vacinação constitui a principal medida de controle e prevenção da FA, além do combate aos mosquitos vetores (Brasil, 2004, 2009). Apesar das diversas campanhas de vacinação, o Brasil é o país de maior incidência de FA das Américas e com a maior letalidade dos casos: no período de 1980 a 2004, foram confirmados 662 casos de febre amarela silvestre, com ocorrência de 339 óbitos, representando uma taxa de letalidade de 51% no período (WHO, 2005; Brasil, c2014c).

A vacina de febre amarela (VFA) atenuada, produzida no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) desde 1937, é uma preparação liofilizada do vírus atenuado da cepa 17D, de origem Nova-Iorquina, que foi isolado do paciente africano Asibi

em 1927. Sua atenuação foi devida a modificações genéticas geradas por sucessivos cultivos em sistemas diversos como macacos, mosquitos, tecido de embrião de galinha desprovido de sistema nervoso central, até originar a cepa atual da vacina (Benchimol, 2001).

Desde 2001, o Complexo Tecnológico de Vacinas (CTV) / Bio-Manguinhos é pré-qualificado junto à Organização Mundial da Saúde (OMS) para o fornecimento nacional e internacional da VFA, que é produzida obedecendo-se às normas estabelecidas pela própria Organização, pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) (Bio-Manguinhos, c2013a).

A vacina é obtida a partir do cultivo do vírus atenuado em ovos embrionados de galinha SPF (do inglês *Specific Pathogens Free*- livre de patógenos específicos): os ovos viáveis são inoculados com 9 dias de desenvolvimento após a ovoscopia, e no 12º após uma segunda ovoscopia, os embriões viáveis são destinados à confecção da suspensão viral da VFA. O produto intermediário precursor da vacina é avaliado quanto à esterilidade, concentração de vírus e a quantidade de nitrogênio protéico. Se aprovado, inicia-se o processo de clarificação para a remoção dos resíduos celulares, cujo produto também será submetido a testes de controle de qualidade, e se aprovado, são aditados estabilizantes para então a vacina ser liofilizada e envasada.

A vacinação contra a FA é gratuita e de responsabilidade do PNI desde 1994 (Brasil, 1998). Sua aplicação é via subcutânea e indicada para crianças a partir de 9 meses de vida, e a dose reforço recomendada é de 10 anos em 10 anos, principalmente para quem vive ou vai viajar para regiões endêmicas (Bio-Manguinhos). Os efeitos colaterais como febre, dor indicada para crianças menores de 6 meses de vida devido ao risco de encefalite viral causada pelo vírus atenuado presente na vacina, gestantes (infecção viral no feto), pessoas com imunodeficiências e pessoas alérgicas a componentes do ovo, gelatina e eritromicina, pois estes estão presentes na composição da vacina (Centro de Vigilância Epidemiológica, 2011).

1.3- A Vacina de Sarampo, Caxumba e Rubéola

Dentre as doenças contagiosas transmitidas por vírus através de contato pessoa a pessoa e que podem ser prevenidas pela vacinação se destacam o sarampo, a caxumba e a rubéola. De acordo com a OMS, apesar das campanhas de vacinação estarem diminuindo a

incidência dessas doenças, ainda são registrados surtos em todo o mundo (Brasil, 2002; Brasil, 2013; Bio-Manguinhos, c2013b; WHO, 2013; OMS, c2014).

O sarampo é causado pelo *Measles virus*, do gênero *Morbilivirus*, família *Paramyxoviridae*, que possui genoma de RNA fita simples não segmentado, de polaridade negativa e com 15-16 kb (Gershon & Krugman, 1979; Norrby, 1985; Waterson, 1965). É uma doença altamente contagiosa e representa uma das principais causas de mortalidade infantil nos países da África, alcançando uma letalidade de 5 a 10% nessas populações (Bio-Manguinhos, c2013c). Sua notificação é compulsória e sua evolução pode levar à morte, principalmente em desnutridos, recém-nascidos, gestantes e pessoas com imunodeficiências. No Brasil, a primeira grande campanha de vacinação contra o sarampo foi realizada em 1992, imunizando cerca de 42 milhões de pessoas, e devido às posteriores campanhas e vigilância epidemiológica, a taxa de letalidade da doença atualmente não ultrapassa 0,5%. (Figura 1.1 e 1.2) (Fiocruz, c2014). Entretanto, no ano de 2013 foi registrado no período de janeiro a julho 72 casos de sarampo, quase o dobro do número de casos ocorridos no último surto em território nacional em 2011, quando 42 casos foram confirmados (Secretaria do Estado de São Paulo, 2013).

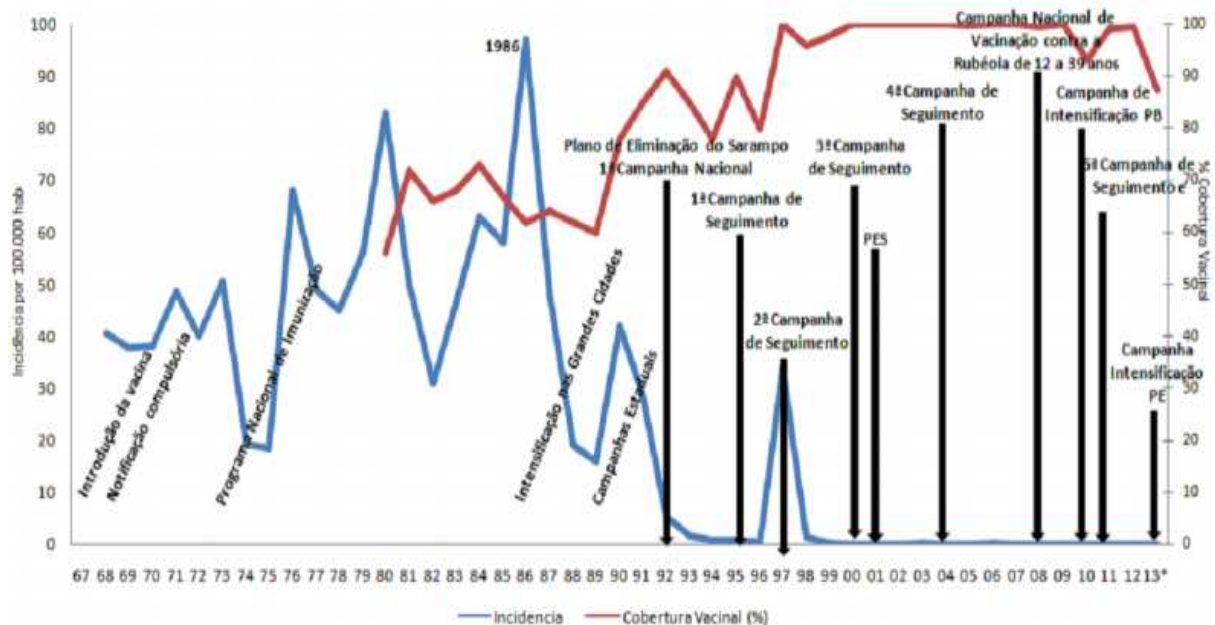


Figura 1.1: Estratégias de Controle de 1980 a 2013* contra o Sarampo com a Incidência dos Casos e Cobertura Vacinal. Brasil, 1980-2013. Fonte: Adaptado de Brasil, c2014a.

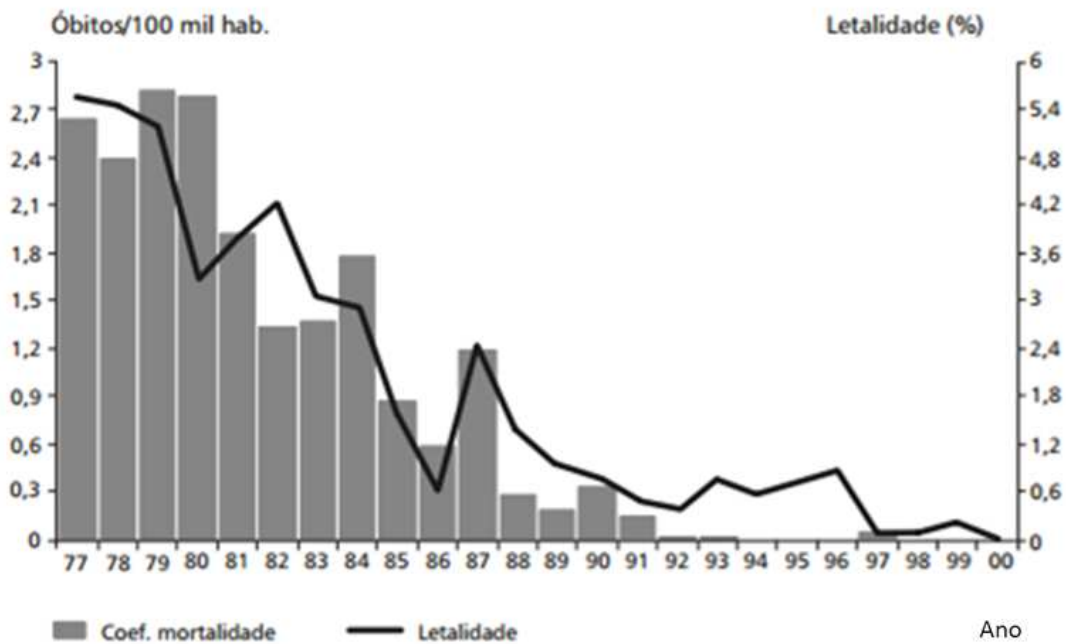


Figura 1.2: Coeficiente de mortalidade e letalidade por sarampo no Brasil entre 1977-2000. Fonte: Adaptado de Brasil, 2005.

A caxumba é causada pelo *Mumps virus*, pertencente ao gênero *Rubulavirus* da família *Paramyxoviridae*. É um vírus envelopado, com genoma de RNA fita simples, de polaridade negativa e com aproximadamente 15 kb de comprimento (Okasaki et al., 1992). Apesar de sua notificação não ser compulsória, a ocorrência de surtos precisa ser relatada (Anderson et al., 1987; Nokes et al., 1990; Brasil, 2005). Nos casos graves, pode causar meningite viral asséptica devido ao tropismo do vírus pelo sistema nervoso central, problemas renais e infertilidade, caso atinja os testículos e ovários principalmente de homens e mulheres adultos, respectivamente.

A rubéola é causada pelo *Rubella virus*, do gênero *Rubivirus*, família *Togaviridae*, é um vírus envelopado de RNA fita simples, polaridade positiva, com cerca de 9,8 kb (Hoby & Vahery, 1970; Sedwich & Sokol, 1970). A sua notificação é de caráter compulsório e o grupo populacional mais afetado é o das crianças (Brasil, 2005). Apesar de ser uma doença com baixa letalidade, pode gerar sequelas irreversíveis na forma congênita, dependendo a sua gravidade da idade gestacional do feto. O diagnóstico laboratorial é realizado por testes sorológicos ou pela detecção do vírus através de técnicas de biologia molecular (Brasil, 2005). O plano para a erradicação do sarampo implementado no Brasil a partir de 1999 impulsionou também a vigilância e o controle da rubéola, cuja incidência decaiu 95% em 2002 em comparação com as taxas registradas em 1997, sendo corroborado pela consolidação em

2002, por todo o país, da campanha de vacinação para mulheres de idade fértil (MIF) (Figura 1.3) (Brasil, 2005).

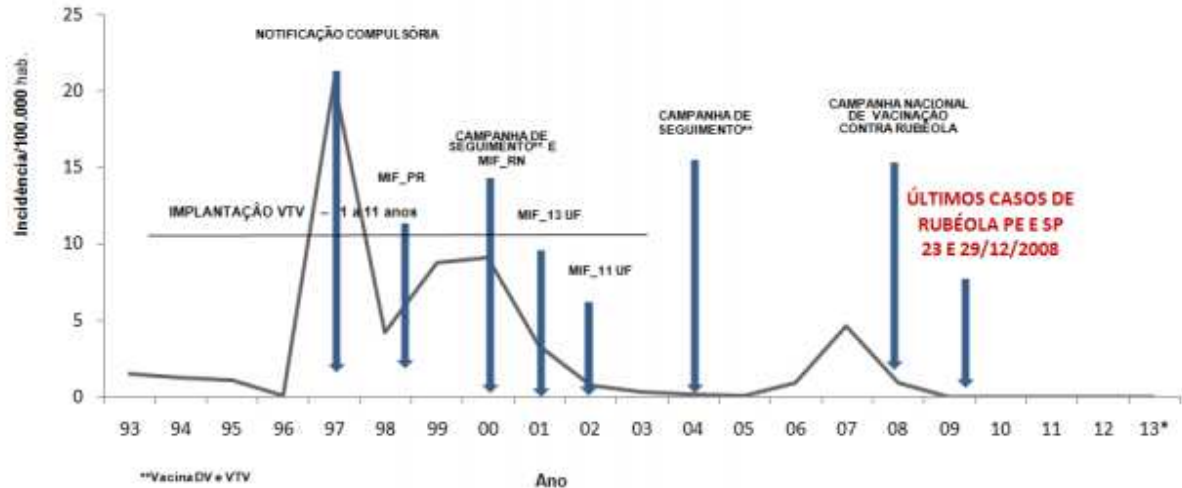


Figura 1.3: Evolução da taxa de incidência de rubéola e estratégias de controle. Incidência de rubéola no Brasil no período de 1993-2013. Fonte: Adaptado de Brasil, c2014b.

A vacina de sarampo, caxumba e rubéola (antiga TVV- vacina tríplice viral) foi introduzida no Estado de São Paulo em 1992, e através do PNI é fornecida para o resto do país desde 1998 (Brasil, 1998).

Até o ano de 2003, este era o único imunobiológico presente no calendário básico de vacinação (CBV) ainda importado pelo MS. Entretanto, no final desse mesmo ano, foi assinada a parceria entre Bio-Manguinhos/Fiocruz e o laboratório privado britânico GlaxoSmithKline (GSK) para a transferência de tecnologia da vacina, de forma a garantir ao Brasil sua auto-suficiência no setor (Bio-Manguinhos, c2014b).

A vacina é de dose única, devendo ser aplicada via subcutânea ou intramuscular em crianças em torno de 12 meses de idade, e a dose de reforço entre 4 e 6 anos de idade. (Brasil, 1998). Seus efeitos colaterais não são comuns e apresentam baixa gravidade, como febre (5 a 10%) e *rash* cutâneo (5%), e o seu aparecimento independe de prévio contato com os vírus decorrentes de infecção natural ou da vacinação prévia. Apesar disso, é contraindicada a sua aplicação em gestantes e imunodeficientes devido ao risco apresentado pela vacina, que é composta com vírus vivos atenuados, pessoas com histórico de reações alérgicas aos componentes da vacina (ovo, gelatina e neomicina) e crianças com Síndrome de Reyer (Centro de Vacinação de Adultos, 2006).

A vacina é feita a partir da combinação de vírus atenuados do sarampo (cepa Schwarz), da caxumba (cepa RIT 4385 derivada da cepa Jeryl-Lynn) e da rubéola (cepa Wistar RA27/3). Apesar da combinação de vírus, a sua eficácia para a proteção contra as três doenças é superior a 95% (Centro de Vacinação de Adultos, 2006). Os primeiros são cultivados em fibroblastos de embrião de galinha (CEF), e o da rubéola em células diplóides humanas MRC-5, de forma a atender os requisitos da ANVISA sobre a fabricação de substâncias biológicas. Os *bulks* (concentrados virais) monovalentes de sarampo, caxumba e rubéola são misturados juntamente com volumes apropriados de excipientes e estabilizadores. A vacina trivalente é, então, envasada e liofilizada. (Bio-Manguinhos, c2013b).

Para o fornecimento da vacina para a população, são feitos inúmeros testes de controle de qualidade (CQ), como a pesquisa de vírus adventícios nos *bulks* monovalentes de sarampo, caxumba e rubéola e avaliação do conteúdo de albumina bovina do *pool after clarification* (PAC), que constitui a preparação da vacina com os *bulks* monovalentes.

1.4- A Garantia da Qualidade

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº21 da ANVISA (Brasil, 2003b), a qualidade de um imunobiológico é assegurada pela Garantia da Qualidade (GQ), que dentro de uma organização, serve como ferramenta de gerenciamento, e em situações contratuais, serve também para gerar confiança no fornecedor.

A GQ é a totalidade das providências tomadas com o objetivo de garantir que os medicamentos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos para que possam ser utilizados para os fins propostos. Dentre diversas exigências, devem ser realizados todos os controles, incluindo o microbiológico, nas matérias-primas, produtos intermediários, produtos a granel, bem como outros controles em processo, calibrações e validações. Além do controle de qualidade, são incorporadas à GQ as BPF, o projeto e o desenvolvimento de um produto, dentre outros (Brasil, 2003a, 2003b).

1.4.1- Departamento de Controle de Qualidade

O Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos (DEQUA) é responsável pela realização de testes apropriados para garantir o controle de cada etapa do

processo de produção de um produto, atendendo às exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003a), FDA e OMS (Bio-Manguinhos, c2013a).

A Seção de Testes Biomoleculares e Imunocitoquímica (SETBI) do Laboratório de Controle Microbiológico (LACOM) do DEQUA realiza alguns dos inúmeros testes de controle de qualidade em imunobiológicos e insumos de produção. Dentre eles podem se destacar: a pesquisa de vírus adventícios nos produtos intermediários da vacina de sarampo, caxumba e rubéola; testes de ovoalbumina residual na VFA; testes de endotoxina bacteriana em biofármacos, imunobiológicos e diluentes de vacina; e a detecção molecular de *Mycoplasma* sp. e *Acholeplasma laidlawii* nos produtos intermediários e produto acabado a granel (PAG) da VFA e em soro animal, o qual é fornecido como suplemento de meios de cultivo utilizados em diversos setores do DEQUA.

A aprovação no CQ microbiológico das matérias-primas, processos intermediários e produtos finais consiste em uma das exigências para liberação dos produtos biológicos no mercado, uma vez que sua importância se deve pela minimização dos riscos de contaminação de pacientes que os utilizam (Farmacopeia Brasileira, 2010; Farmacopeia Europeia, 2010).

1.4.2- Caracterização dos microrganismos da classe *Mollicutes* - A importância da pesquisa de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*

O gênero *Mycoplasma* é composto por procariontes pertencentes à classe *Mollicutes*, de pequena dimensão e desprovidos de parede celular, tornando-os resistentes a penicilina e seus derivados (Murray et al., 1984). Estão amplamente distribuídos no meio ambiente como parasitas humanos e outros mamíferos, répteis, peixes, artrópodes e plantas. Algumas espécies são frequentemente encontradas no ambiente laboratorial, contaminando, dentre outras matérias-primas, culturas de células e meios de cultura em processos de fabricação, e em laboratórios de pesquisa (Hsiu-Shuei et al., 2007). A ausência de parede celular e seu tamanho contribuem para a facilidade de contaminação, pois permitem sua passagem por filtros de até 0,2 µm utilizados em métodos de esterilização de cultura de células (Figura 1.4).

Algumas das espécies mais patogênicas para humanos é *Mycoplasma pneumoniae*, um dos principais agentes etiológicos das pneumonias adquiridas na comunidade, causando essa doença principalmente em crianças e jovens e lesões extra-pulmonares com menor frequência (Center of Disease Control and Prevention, 2014); *Mycoplasma orale*, presente normalmente na cavidade oral, podendo ser um patógeno oportunista para indivíduos imunodeficientes; e

Mycoplasma fermentans, que provoca infecções nas articulações e no trato respiratório e que vem sendo associado ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Katseni et al., 1993; Chingbingyong et al., 1996; Schaeffer et al., 1996; Razin et al., 1998).

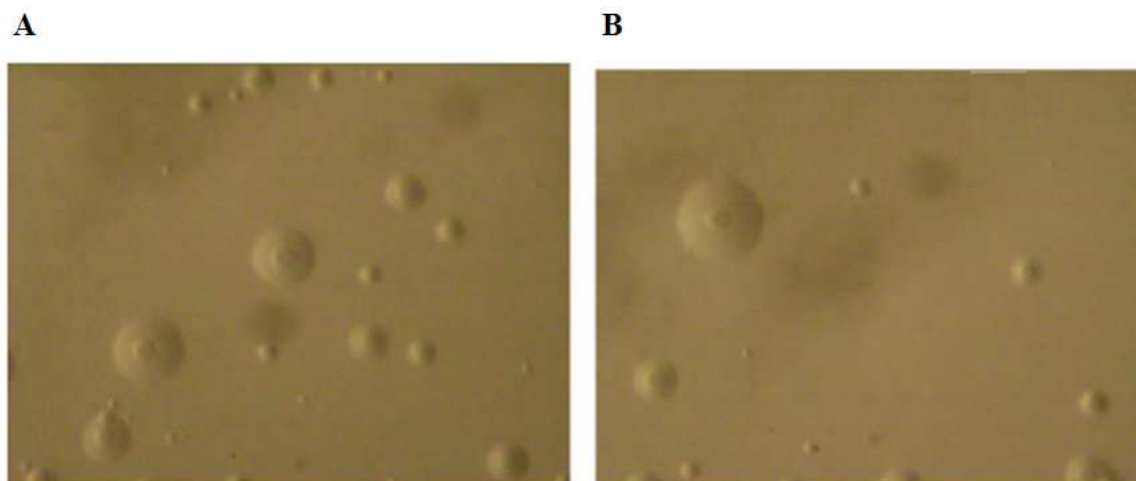


Figura 1.4: Cultivo em ágar de colônia com aspecto de ovo estrelado característica de micoplasmas. **A:** Exsudado de faringe infectada por micoplasmas. **B:** Crescimento em ágar a partir de exsudado vaginal contendo micoplasmas. Fonte: Riveira et al., 2014.

Mycoplasma hyorhinis usualmente infecta suínos gerando doenças o trato respiratório e inflamação nas articulações, e apesar de ser considerado não-patogênico para humanos, vem sendo associado como patógeno em casos clínicos de câncer gástrico, cólon, fígado e próstata. (Noelle et al., 1992; Kobisch & Friis, 1996; Huang et al., 2001; Urbanek et al., 2011).

Mycoplasma arginini é um importante patógeno causador de doenças do trato respiratório em ovelhas e cabras (Goltz et al., 1986). *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* causam doenças respiratórias crônicas e infecções nas articulações em frangos e perus (Buim et al., 2009). Além disso, são comumente encontrados em matérias-primas de origem aviária (Farmacopeia Europeia, 2010) utilizadas durante o processo de produção de imunobiológicos, causando efeitos citotóxicos em células hospedeiras, depleção dos nutrientes do meio, além de modificações genotípicas e fenotípicas, como a inibição do metabolismo celular, interferência na síntese de ácidos nucleicos e expressão modificada de moléculas na superfície celular (Hsiu-Shuei et al., 2007). De acordo com as normas nacionais e internacionais de BPF, preconiza-se a detecção e eliminação desta contaminação (Farmacopeia Brasileira, 2010; Farmacopeia Europeia, 2010).

Acholeplasma laidlawii é uma espécie pertencente à classe *Mollicutes* que pode ser encontrada na forma livre ou como parasita no meio ambiente, e no meio laboratorial,

representando um microorganismo indesejável para indústria de imunobiológicos devido a sua contaminação em diversos tipos de meios de cultivo (Wang et al., 2004).

1.4.3- Pesquisa de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii* segundo a Farmacopeia Europeia 7.0

Para o controle microbiológico de produtos como a vacina de sarampo, caxumba e rubéola, VFA e insumos de processos, são preconizados os métodos de cultivo direto ou indicador de cultura de célula, quando forem analisados bancos de células, lote semente de vírus ou células-controle. Essas metodologias podem ser substituídas por testes NAT (*Nucleic Acid Amplification Techniques* – Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos) para detecção de material genético amplificado, desde que haja validação devida (Farmacopeia Europeia, 2010).

O método de cultivo direto para detecção de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii* é capaz de detectar até 10 UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) a partir de pequenas quantidades de amostra que são inoculadas em meios de cultivo sólido e líquido enriquecidos para o crescimento desses microrganismos (Farmacopeia Europeia, 2010). Após o período de cultivo, pequenas alíquotas do meio líquido são sub-cultivados em meio sólido e analisados por microscopia óptica para a presença de colônias típicas de micoplasmas. Apesar de ser considerado o padrão-ouro, a aplicação apenas desta metodologia pode levar à aprovação de produtos contaminados que apresentam risco para população, pois nem todas as espécies de micoplasmas são cultiváveis em meios de cultura, ou o seu crescimento, normalmente de difícil execução, pode ser inibido por interferentes presentes nos próprios imunobiológicos. Adicionalmente, esta técnica é laboriosa e demorada, pois requer meios específicos para o seu cultivo, e o período de incubação da cultura varia de 28 a 35 dias.

O método indicador de cultura pode ser uma alternativa nos casos de espécies não cultiváveis, pois utiliza uma molécula fluorescente intercalante de DNA como sistema de revelação. O produto a ser testado é adicionado a uma cultura de células, que é cultivada por pelo menos 3 dias ou até atingir a confluência. Após esse período, uma subcultura é recomendada por mais 3-5 dias para aumentar a sensibilidade do teste, e às culturas é adicionado um fluoróforo que se ligará ao DNA tanto das células cultivadas quanto dos micoplasmas presentes. A identificação de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii* é feita pela visualização de características particulares por microscopia de fluorescência, como a presença de pequenos pontos ou filamentos no espaço intracelular. Apesar da maior rapidez quando

comparado ao método de cultivo, sua sensibilidade é baixa, detectando contaminação a partir de 100 UFC/mL (Farmacopeia Europeia, 2010, Chandler & Volokhov & Chizhikov, 2011).

As técnicas NAT possuem vantagens em relação às metodologias acima citadas, pois possibilitam a detecção de microrganismos contaminantes a partir da amplificação de DNA extraído da amostra, não necessitando de que eles estejam viáveis. Além disso, são mais sensíveis, detectando-os mesmo em baixas concentrações, possuem maior biossegurança, já que não há cultivo de microrganismos, são mais rápidas e apresentam maior robustez, podendo resistir a pequenas variações durante o procedimento (Farmacopeia Europeia, 2010).

1.5- Técnicas de amplificação de DNA

Dentre diversas técnicas NAT, podem-se destacar a Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) convencional ou a PCR em tempo real (qPCR), que amplificam o material genético (DNA ou cDNA) de forma exponencial a cada ciclo de reação, gerando de centenas a milhares de cópias (Rumsby, 2006).

A base de uma PCR consiste na amplificação de uma sequência específica do DNA molde através das etapas de desnaturação, pareamento e extensão. Inicialmente, as dupla-fitas do DNA são desnaturadas em fita simples pelo aquecimento a 95 °C, liberando os sítios que serão reconhecidos pelos iniciadores. Em seguida, a amostra é submetida à temperatura de pareamento, que é específica para cada iniciador, mas que varia em torno de 60 °C. Nesta etapa, os iniciadores senso e anti-senso se pareiam de forma complementar e específica ao alvo, e a formação do complexo iniciador-DNA permite o seu reconhecimento pela enzima *Taq* polimerase, que promoverá a extensão da fita cópia pela adição dos nucleotídeos à região 3' do iniciador (Figura 1.5) (Rumsby, 2006).

No caso da PCR convencional, após o fim das reações, os produtos amplificados (*amplicons*) são submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose para a avaliação qualitativa da presença do material genético das bactérias em questão. Apesar desta técnica ser um teste NAT, ela apresenta desvantagens - quando comparada à outras técnicas de mesmo princípio-, dentre as quais se destacam: a demora de no mínimo dois dias para liberação do laudo de avaliação do controle de qualidade microbiológico pelo setor, devido às diversas etapas necessárias entre a extração do DNA e a obtenção dos resultados; o risco de contaminação de outras amostras e do ambiente laboratorial, gerado pela manipulação

necessária dos *amplicons* durante o procedimento; o uso de intercalantes de DNA na etapa de coloração do gel de agarose, que podem apresentar risco ocupacional para os analistas e sensibilidade para até 10 UFC/mL (Farmacopeia Europeia, 2010).

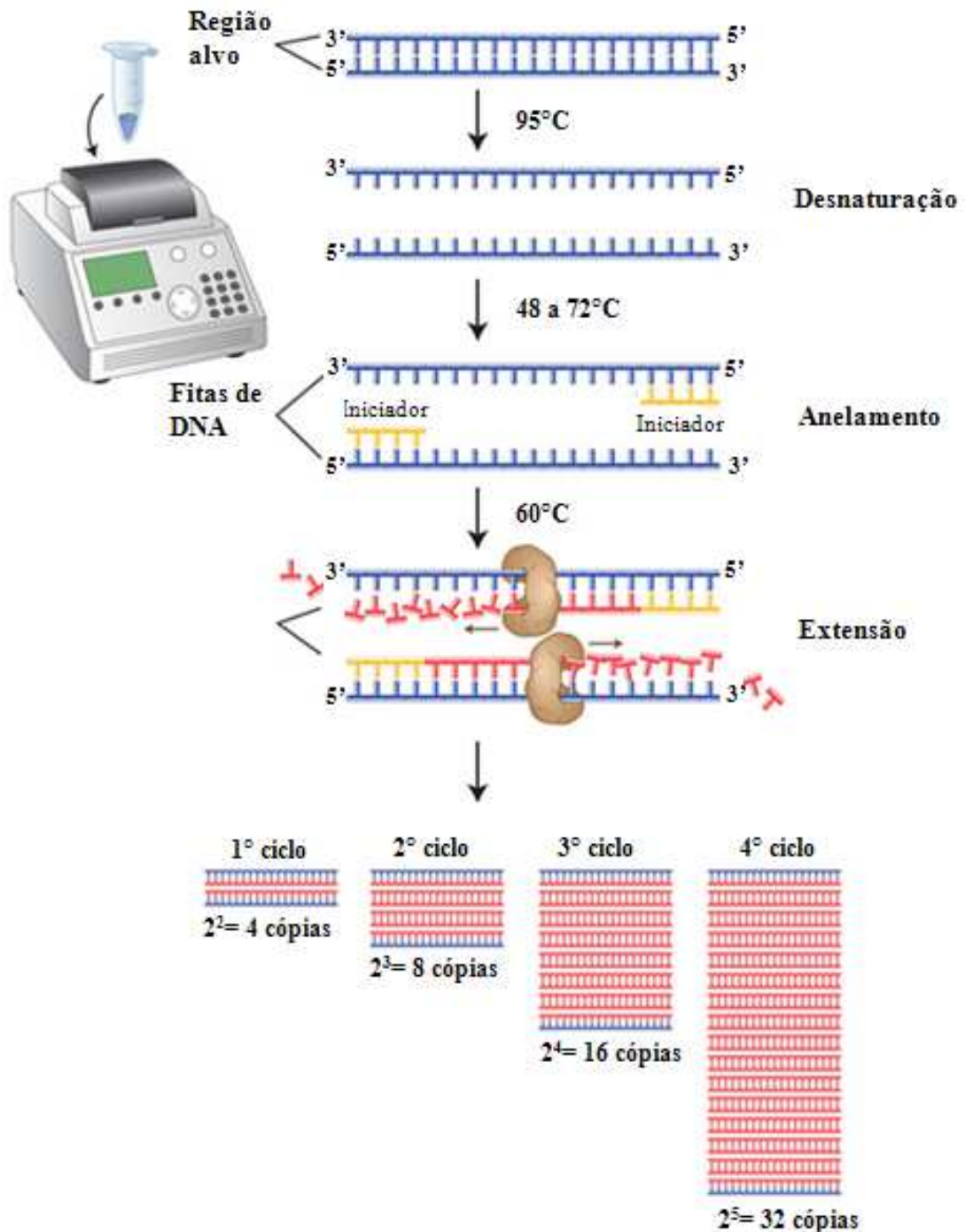


Figura 1.5: Amplificação de DNA alvo pela PCR. Na primeira etapa do ciclo as amostras são submetidas à temperatura de 95°C para a desnaturação das fitas de DNA, permitindo posteriormente o pareamento dos iniciadores e a extensão da fita cópia, sob temperaturas específicas da reação. Conforme há a ocorrência dos ciclos, o número de cópias aumenta de forma exponencial. Fonte: [adaptado] New England Biolabs®.

Uma alternativa à PCR convencional seria a qPCR, em que podem ser utilizados diversos sistemas de detecção que permitem a geração de resultados específicos com maior sensibilidade e em menor tempo. Com essa metodologia, a amplificação do DNA e a revelação dos resultados são obtidos em um único passo, o que proporciona a semi-automação dos processos, a diminuição dos riscos ocupacionais e de contaminação pela ausência de manipulações pós-PCR, e a maior rapidez do ensaio. Dessa forma, a qPCR representa uma melhoria da PCR convencional e pode ser considerada uma técnica complementar ao cultivo direto, o qual ainda é considerado na literatura o padrão-ouro para a detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* (Ferreira, 2005; Farmacopeia Europeia, 2010) (Tabela 1).

Tabela 1: Diferenças entre as técnicas de cultivo, indicador de cultura, PCR convencional e qPCR.

Parâmetros para caracterização	Técnica			
	Cultivo direto	Indicador de cultura	PCR convencional	qPCR
Tempo de execução	28-35 dias	6-8 dias	pelo menos 2 dias	1 dia
Sensibilidade	≥10 UFC/mL	≥100 UFC/mL	≥10 UFC/mL	≤ 1UFC/mL
Especificidade	Variável	Variável	25 espécies [#]	> 25 espécies [*]
Automatização	Manual	Manual	Manual	Semi-Automatizado
Riscos	Falso negativo Contaminação cruzada e do laboratório	Contaminação das amostras e do laboratório	Contaminação das amostras, do laboratório e ocupacionais	Contaminação das amostras

[#] quantidade de espécies de *Mycoplasma* sp.e *A.laidlawii* reconhecida pelos iniciadores utilizados na SETBI;

^{*} variável, dependendo do desenho dos iniciadores.

1.5.1- A técnica de qPCR

A qPCR é o método atualmente mais sensível introduzido na rotina laboratorial para detecção de sequências genômicas específicas em amostras biológicas de diversas fontes, e vem sendo amplamente utilizado, principalmente, no que diz respeito à área microbiológica (Lind et al., 2006). Esta técnica pode ser usada de forma qualitativa, detectando a presença ou ausência de um DNA na amostra, ou quantitativa, determinando a concentração do material genético específico amplificado (Raymaekers et al., 2009).

A qPCR combina a base da PCR convencional com o uso de moléculas fluorescentes, ou sondas marcadas com fluorescência. Ao se ligarem às fitas de DNA, essas moléculas são detectadas em tempo real, ou seja, conforme há a ocorrência dos ciclos de amplificação, por um sistema óptico presente no termociclador que contém filtros específicos para diversos comprimentos de onda emitidos por fluoróforos específicos (Figura 1.6). O sinal fluorescente

captado é convertido em um valor numérico para um gráfico formando uma curva, que pode ser plotada em escala semi-logarítmica ou linear (Figura 1.7) (Nolan et al., 2013).

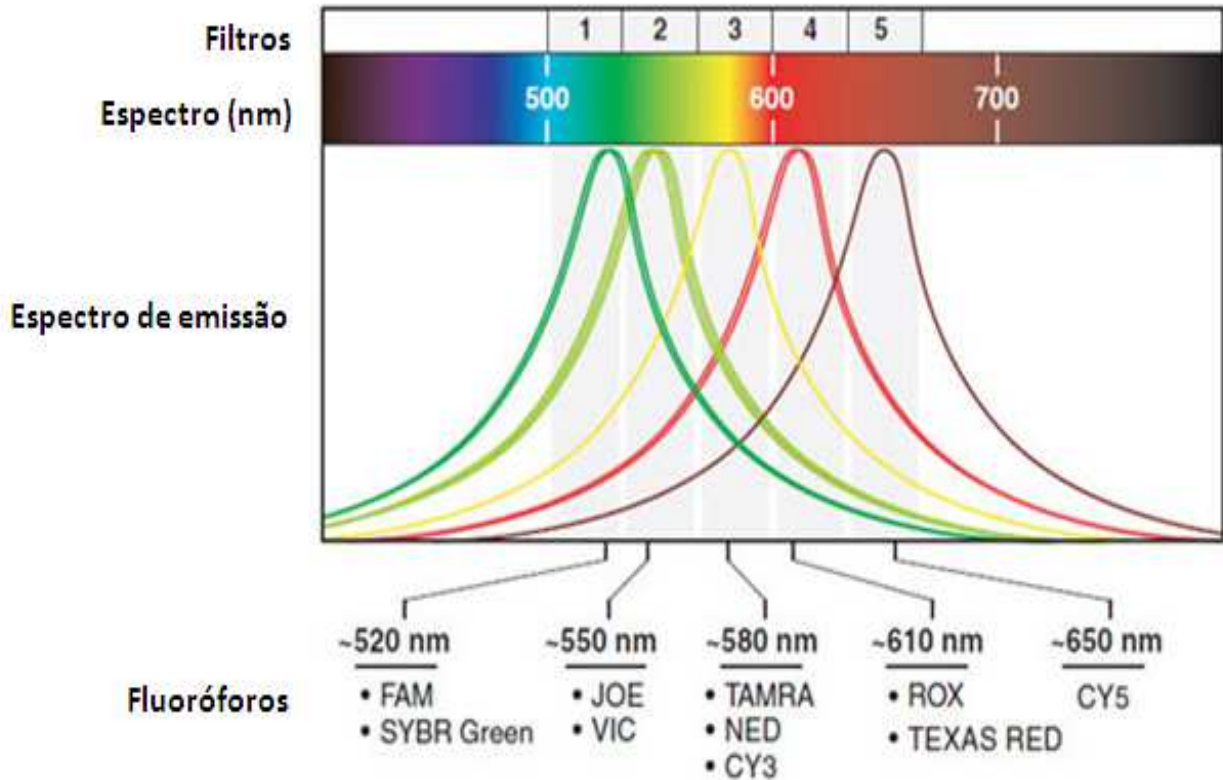


Figura 1.6: Filtros do sistema óptico de um aparelho de qPCR. Cada filtro é capaz de captar uma faixa de comprimento de onda emitida por um fluoróforo específico. Fonte: [adaptado]: Life Technologies[®]. Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/technical-resources/technical-reference-library/real-time-digital-PCR-instruments-support-center/7500-real-time-pcr-systems-support/7500-real-time-pcr-systems-support-getting-started.html>

A curva de amplificação de uma reação de qPCR pode ser dividida em três fases: ruído (em inglês *background*), fase exponencial e platô. O ruído é um sinal que pode ser visualizado no gráfico no início da amplificação, mas por ser muito fraco e não ultrapassar a fluorescência do meio, não é considerado significativo. Conforme há a ocorrência dos ciclos, o número de cópias de DNA aumenta exponencialmente e gera um acúmulo da fluorescência, que passa a ser detectada e reproduzida no gráfico- fase exponencial-, e cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de material genético presente na amostra. O aumento de cópias de DNA ocorre até alcançar um platô devido a limitações na reação, como o esgotamento de reagentes, indicando o final do processo de amplificação (Raymaekers et al., 2006) (Kubista, 2006) (Figura 1.7).

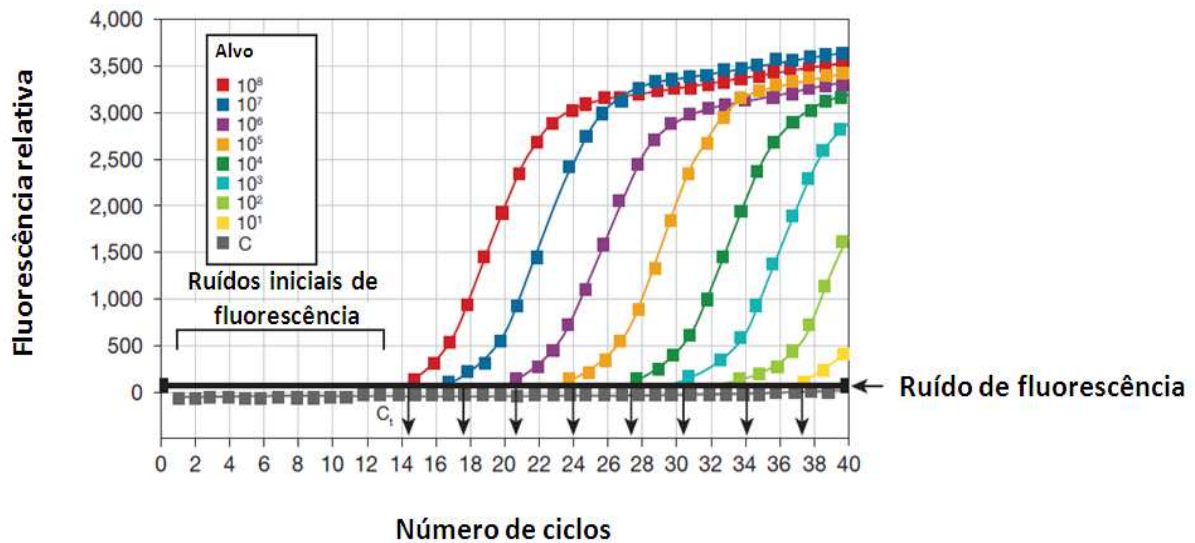


Figura 1.7: Gráfico de amplificação de qPCR representado por uma curva de qPCR linear de amostras diluídas com fator 10. A intensidade de fluorescência de cada alvo é plotada em relação ao número de ciclos em que foi detectada, de forma a construir uma curva que permite avaliar o processo de captura de sinal durante toda a amplificação. As amostras mais concentradas emitem fluorescência em ciclos de número menor do que aquelas menos concentradas. Fonte: [adaptado] qPCR Handbook Invitrogen.

1.5.1.1- Sistemas de detecção

Dentre os diversos sistemas de detecção para qPCR se destacam as sondas de hidrólise e os intercalantes de DNA. As sondas de hidrólise são sequências específicas de nucleotídeos complementares às regiões alvo do DNA associadas a duas moléculas: o repórter, que possui a fluorescência que será detectada na reação, e o *quencher*, uma molécula supressora que, pela sua proximidade com o repórter, inibe a sua fluorescência. Na etapa de pareamento, os iniciadores e as sondas, ainda intactas e, portanto, sem emitir fluorescência, hibridizam nas regiões complementares do DNA. Iniciada a etapa de extensão, a enzima *Taq* polimerase, que possui atividade 5'-nuclease, cliva a sonda e libera a molécula com fluorescência, que ao se distanciar do *quencher*, passa a ser detectada (Figura 1.8) (Kubista et al., 2006). Esse sistema é o único utilizado em ensaios quantitativos - uma vez que a especificidade é garantida não só pelos iniciadores, mas também pelo uso das sondas- sendo também o mais indicado em ensaios multiplex, em que se utiliza mais de um conjunto de iniciadores (Life Technologies®, 2012).

Em relação aos diversos intercalantes de DNA comercializados pode-se destacar o SYBR® Green, um fluoróforo (em inglês *dye*) em suspensão no mix de reação com alta afinidade por DNA fita dupla e baixa por DNA fita simples e RNA. Ao se ligar ao material

genético presente na amostra, emite intensa fluorescência se comparado ao fluoróforo não associado.

No início dos ciclos da qPCR, pode-se verificar a presença de uma linha de base (em inglês *baseline*) gerada por um sinal de fluorescência muito baixo, que por isso não é considerado. Se o alvo estiver presente na reação, haverá um acúmulo de sinal fluorescente ao longo da amplificação que, a partir de um determinado ponto, passará a ser detectado (Figura 1.9) (Life Technologies[®], 2012).

A especificidade da reação utilizando este sistema é garantida pelo uso de iniciadores específicos e pela observação da curva de dissociação dos fragmentos de DNA gerados, tornando-se uma ótima escolha para testes qualitativos em que se detecta presença ou ausência de um alvo. Além disso, é uma alternativa às sondas de hidrólise devido à sua simplicidade e menor custo.

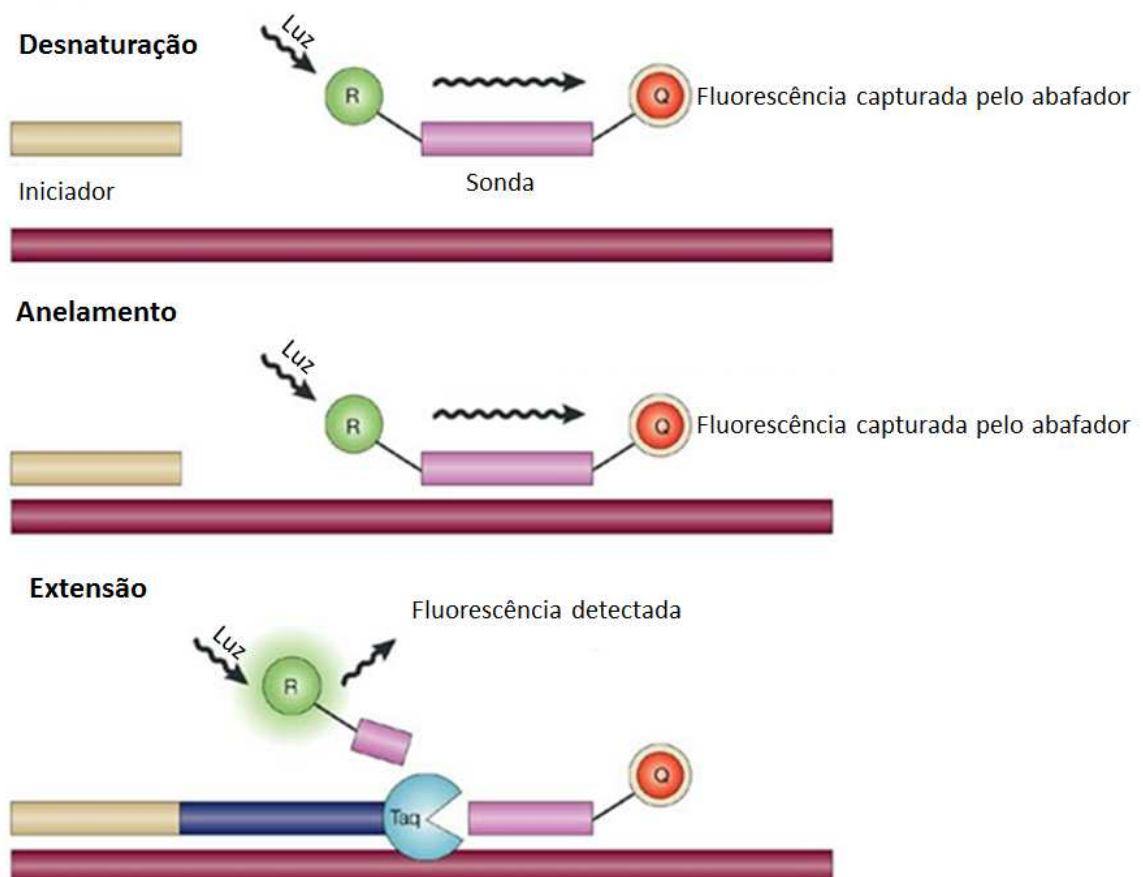


Figura 1.8: Amplificação por qPCR com sondas de hidrólise TaqMan[®]. Na etapa de desnaturação das fitas de DNA, a sonda intacta não emite fluorescência devido à proximidade do *quencher* com o repórter. No pareamento, ambos os iniciadores e sondas hibridizam com o DNA molde. A enzima *Taq* polimerase, que possui atividade 5'-nuclease, ao promover a extensão da outra fita, hidroliza a sonda e libera o repórter, cuja fluorescência passará a ser detectada pelo aparelho. Fonte: [adaptado] Koch, 2004.

SYBR Green I



Figura 1.9: Amplificação por qPCR utilizando sistema SYBR[®] Green. Até a etapa de pareamento, a fluorescência do sistema é baixa, uma vez que o SYBR[®] Green somente a emite de forma intensa quando intercalado à dupla fita de DNA. Dessa forma, o maior nível de intensidade será detectado no final da etapa de extensão, em que houve a formação completa do fragmento de dupla-fita de DNA. Fonte: [adaptada] van der Velden, 2003.

1.5.1.2- Prospecção dos iniciadores

Apesar de não haver um consenso com relação ao tamanho dos iniciadores, estes não devem ser menores do que 15 pb pois diminuem a especificidade da reação, e nem ultrapassar 30 pb, pois assim há o aumento das chances de formação de alças e dímeros (Raymaekers et al., 2009; Life Technologies[®], 2012).

Para o cálculo da T_m dos oligonucleotídeos existem diversas fórmulas, das quais a mais aceita é a baseada no modelo do “vizinho mais próximo” (em inglês *Nearest Neighbor Model*), que considera a influência termodinâmica das bases vizinhas em relação a uma base particular no processo de hibridização (Santa Lúcia, 1998). Há um consenso na literatura de que a T_m ideal para ambos os iniciadores senso e anti-senso é de 60 °C, apesar da temperatura ótima da *Taq* ser de 72 °C. Além disso, a diferença de T_m entre eles não deve ultrapassar 5 °C, evitando assim que haja a diminuição da eficiência e da especificidade da reação (Rychlik & Rhoads, 1989; Raymaekers et al., 2009; Life Technologies[®], 2012).

É recomendado que o conteúdo CG seja em torno de 45%, garantindo a estabilidade da ligação entre os iniciadores e o DNA molde, e não ultrapassar 55%, pois o elevado número

de ligações entre as bases CG, por serem formadas por três pontes de hidrogênio, poderia dificultar a dissociação do iniciador e do DNA necessária para o início de um novo ciclo de amplificação e elevar a T_m muito acima de 60 °C (Raymaekers et al., 2009; Spandidos et al., 2009; Life Technologies[®], 2012).

A formação de alças nos iniciadores é indesejável, e se ocorrerem devem ser desfeitas com facilidade. Assim, o pequeno aumento de temperatura que ocorre durante a qPCR deve ser suficiente para que romper essas estruturas secundárias para os iniciadores se mantenham linear durante a etapa de pareamento. De acordo com a expressão $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, que indica a espontaneidade da reação, quanto menor o valor encontrado - que representa a energia necessária para a formação das alças (em kcal/mol) - mais estável são as alças dos oligonucleotídeos. Além disso, a presença dessas estruturas na região 3' devem ser evitadas pois afetam negativamente a eficiência da reação (PREMIER Biosoft[®], 2015).

Os iniciadores devem possuir baixa complementariedade entre si, evitando assim a formação de homodímeros (ligação entre iniciadores iguais) e heterodímeros (entre diferentes iniciadores da reação), e quanto menor a energia necessária para a sua formação, maior a probabilidade de ocorrência. Por isso, foi considerada a força de ligação de até -9 kcal/mol e/ou até quatro ligações entre as bases dos iniciadores, não podendo estas ocorrerem nas últimas três bases da porção 3', pois esse evento impediria o pareamento da região do iniciador com o DNA que é reconhecido pela enzima *Taq* na etapa de extensão. Adicionalmente, deve ser evitada a presença de bases CG na porção 3', o que poderia dificultar o completo desligamento do iniciador com o DNA ao final da etapa de extensão, diminuindo a eficiência da reação (Mitsuhashi, 1996; Simonsson et al., 1998; Spandidos et al., 2009; Life Technologies[®], 2012).

1.5.1.3- Parâmetros da qPCR

1.5.1.3.1- *Threshold*

O *threshold* significa o limiar entre o sinal de fluorescência considerado como ruído e o início do sinal de amplificação estatisticamente significativo para a detecção do alvo. Geralmente, o *software* o determina automaticamente, mas ele pode ser posicionado no gráfico manualmente em qualquer ponto da fase exponencial da curva (Life Technologies[®], 2012).

1.5.1.3.2- Cycle Threshold (C_q)

O C_q corresponde ao número do ciclo em que o sinal de fluorescência ultrapassa a linha de *threshold*. Esse parâmetro é crucial para ensaios quantitativos em que é calculado o número de cópias de DNA, e seu valor é inversamente proporcional à quantidade inicial de material genético. Se houver interesse em quantificar o DNA com acurácia, é importante posicionar o *threshold* no início da fase exponencial, uma vez que os reagentes ainda estão em excesso, a eficiência da *Taq* é alta, e o produto amplificado, que ainda está em baixa concentração, não irá competir com a capacidade de pareamento dos iniciadores (Figura 1.10) (Pfaffl, 2001; Ramakers et al., 2003; Life Technologies®, 2012).

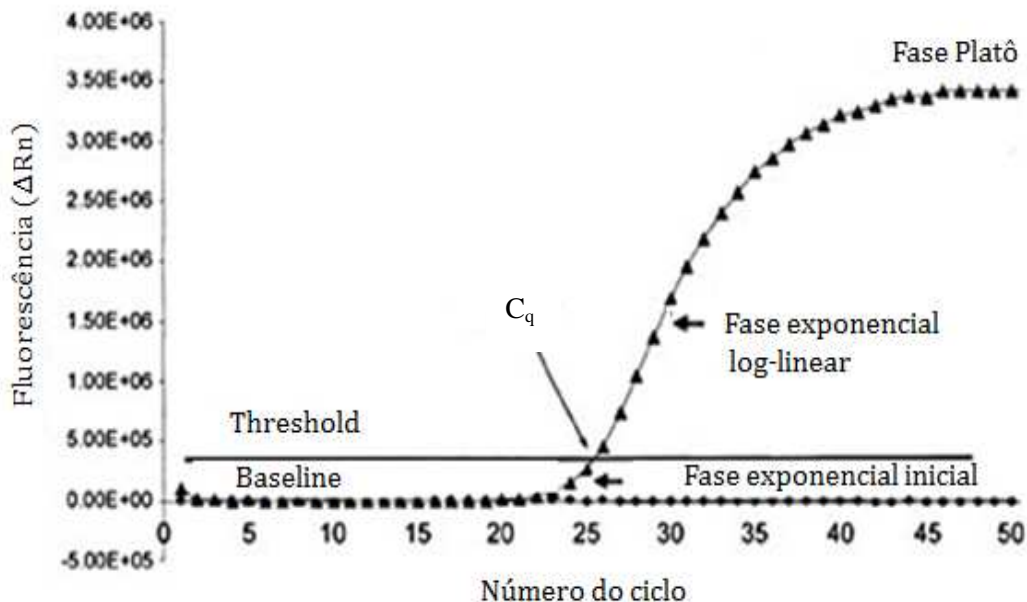


Figura 1.10: Caracterização das etapas de amplificação de uma amostra por qPCR no plot de amplificação em escala linear. No início da amplificação é detectado o *baseline*, cujo sinal de fluorescência é muito fraco e por isso não é considerado significativo para o resultado. Conforme a ocorrência dos ciclos, o número de cópias do DNA aumenta exponencialmente (fase exponencial) até alcançar o platô, indicando o final da reação. Fonte: [adaptado] Ahmed, 2005.

1.5.1.3.3- Curva de dissociação

A especificidade de uma PCR é dada pela escolha de iniciadores específicos para o DNA alvo. Entretanto, é possível que ocorra durante a amplificação a formação de dímeros entre os iniciadores, ou até mesmo a formação de produtos de amplificação inespecíficos.

Uma vez que o sistema de SYBR® Green pode intercalar em outras duplas-fita de DNA que não as de interesse, a maneira de verificar a especificidade da reação é através da

análise da curva de dissociação. Para a sua construção é adicionada, após o final da reação de qPCR, uma etapa para que ocorra o aquecimento gradual das reações até 95 °C. Dentro dessa faixa de temperatura, os fragmentos ali gerados atingirão à sua temperatura de dissociação (do inglês *temperature melting* - T_m) específica, que corresponde à temperatura em que houver a dissociação de 50% das duplas-fitas de DNA ali presentes. A separação do DNA dupla fita leva à uma queda de fluorescência, e essa diferença é detectada e analisada pelo *software* que representa o resultado em um pico no gráfico. É possível diferenciar pela T_m a dupla-fita de DNA alvo amplificada em relação a algum fragmento formado não específico, uma vez que essa temperatura varia de acordo com o tamanho e conteúdo de citosina e guanina (CG) dos *amplicons* e com o aparecimento de bases desencontradas (em inglês *base mismatches*) (Figura 1.14) (Life Technologies®, 2012).

Essa etapa não acrescenta custos financeiros adicionais, não tem impacto significativo no tempo necessário para a obtenção dos resultados e não necessita da manipulação dos produtos amplificados como no caso da PCR convencional.

1.5.1.3.4- Eficiência (E)

A eficiência da reação é um dos parâmetros da qPCR mais importantes que deve ser avaliada para garantir resultados com ótima acurácia e reprodutibilidade. Dentre os métodos utilizados para o seu cálculo pode-se destacar a elaboração de uma curva com a diluição seriada de uma amostra, em que será considerado o coeficiente angular (em inglês *slope*) na seguinte expressão: $E = 10^{(1/slope)} - 1$. Ideologicamente, o *slope* deve ser igual a -3,32, o que indica que a reação teve 100% de eficiência, ou seja, que cada molécula de DNA duplicou ao final de cada ciclo (Life Technologies, 2012).

Na fase exponencial da reação os produtos são formados com uma eficiência constante, e no gráfico plotado em escala semi-logarítmica, essa fase pode ser visualizada como uma reta. Além disso, pode-se aferir que duas reações obtiveram a mesma eficiência se suas curvas puderem ser sobrepostas no gráfico (mesmo se elas tiverem C_q s diferentes) (Figura 1.15) (Rebrikov & Trofimov, 2006).

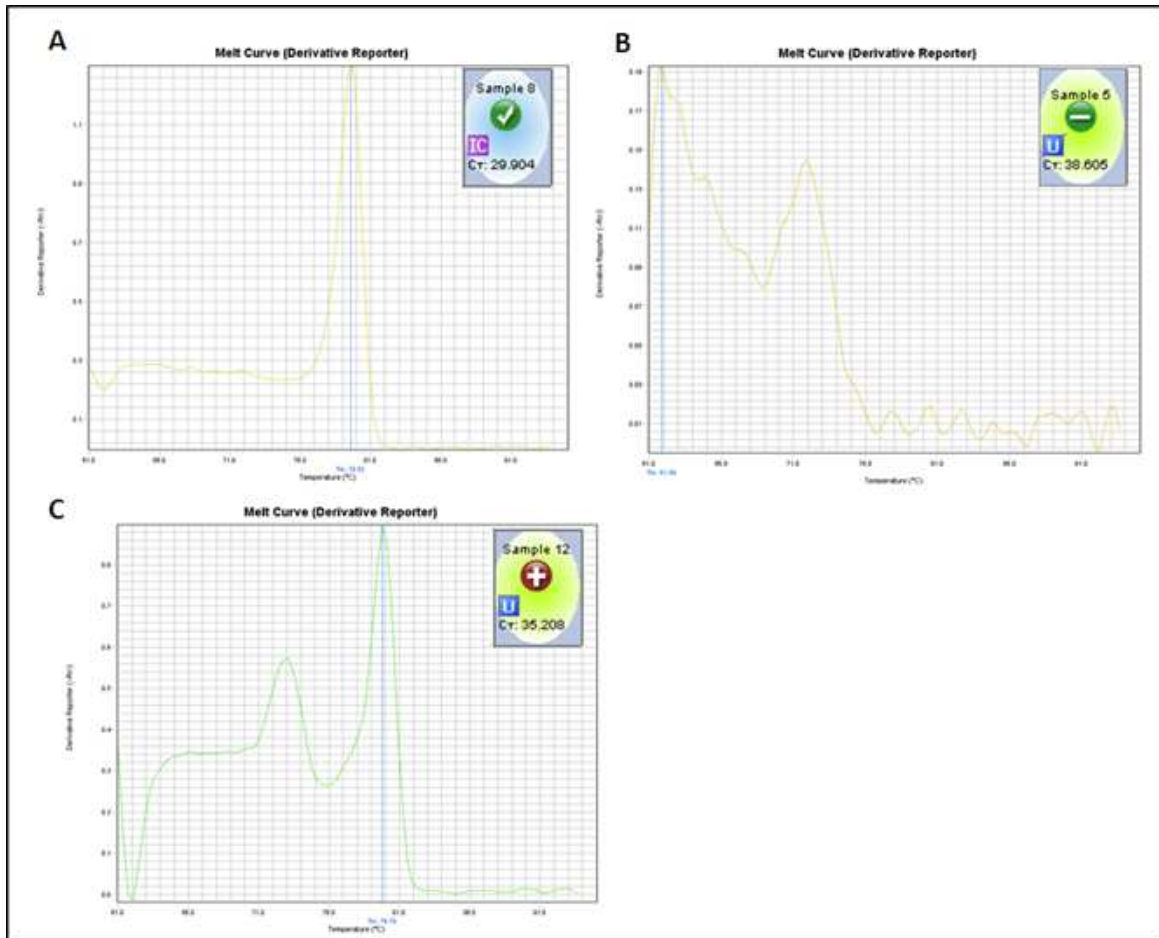


Figura 1.11: Caracterização dos produtos de qPCR através da análise do T_m . **A:** Amostra contendo o controle interno de amplificação, apresentando pico com T_m em 79,62 °C. **B:** Amostra negativa com o pico de amplificação com T_m em 61,89 °C, que é considerada uma temperatura muito baixa e sendo sugestiva de inespecificidade, podendo refletir a temperatura de dissociação de dímeros de *primer*. **C:** Amostra positiva para o DNA alvo, apresentando o controle interno com T_m de 79,6 °C e DNA alvo com T_m esperado de e 73 °C. Fonte: Arquivo padrão de amplificação de micoplasmas do kit de detecção *Mycoseq*[®] (Life Technologies[®]).

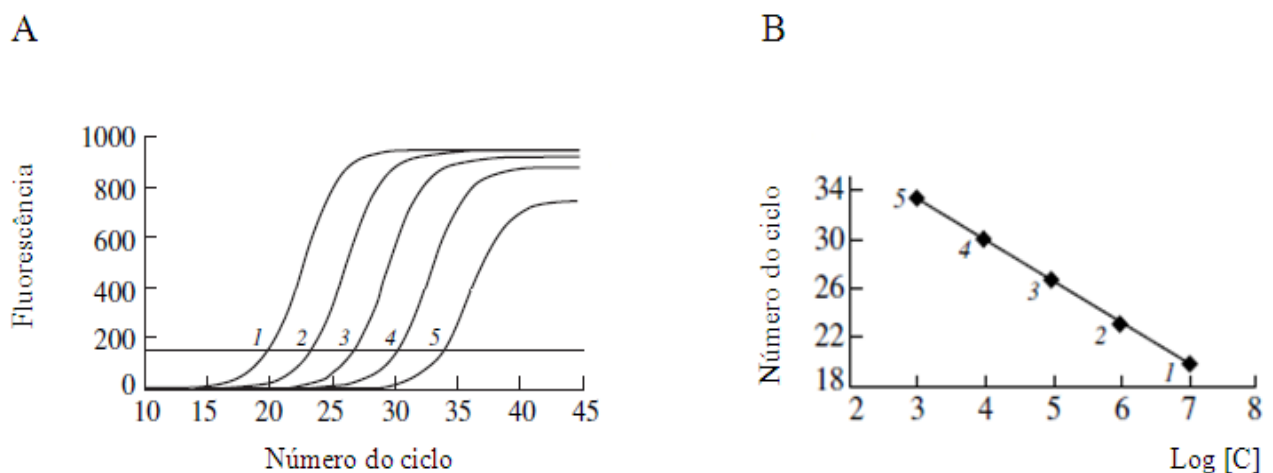


Figura 1.12: Avaliação da eficiência da qPCR utilizando diluições seriadas de uma amostra. **A:** Curvas típicas (1-5) de amplificação de uma diluição seriada de DNA. As curvas em escala semi-logarítmica podem ser sobrepostas demonstrando que as 5 reações obtiveram a mesma eficiência. **B:** Gráfico em escala linear do log da concentração de DNA e o número do C_q correspondente. Fonte: [Adaptado]: Rebrikov & Trofimov, 2006.

Uma boa reação deve ter eficiência entre 90 a 110%, correspondendo ao *slope* de -3,58 e -3,10, respectivamente, e os fatores experimentais que a influenciam mais comuns são: a) tamanho, estrutura secundária e conteúdo CG do fragmento alvo de amplificação e dos iniciadores da reação, b) concentrações de reagentes fora da faixa ótima da reação e c) presença de inibidores nos reagentes e excesso de DNA na reação, que podem gerar eficiência acima de 110%. (Bustin & Nolan, 2004; Wong & Medrano, 2005; Yuan et al., 2006; Life Technologies®, 2012).

1.5.1.3.5- Sensibilidade analítica ou Limite de detecção (LD)

A técnica de qPCR pode ser qualitativa, identificando a presença ou ausência de um alvo específico, ou quantitativa, determinando a quantidade do alvo presente na amostra teste. Em ambos os casos, é necessário o estabelecimento do LD (Raymaekers et al., 2009). Ainda, a determinação deste parâmetro é essencial para diversos setores (Burns & Valdivia, 2008), como o de controle de qualidade aplicado à detecção de contaminantes bacterianos em produtos biológicos.

A sensibilidade analítica pode ser expressa como o LD, que corresponde à menor concentração do analito alvo que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado como um valor exato, e distinguível de um resultado igual à zero (Saunders & Parkes, 1999; Raymaekers et al., 2009; Farmacopeia Europeia, 2010). Este parâmetro varia de acordo com diversos fatores como:

- a) os procedimentos iniciais de amostragem, uma vez que a escolha da fonte primária de onde será extraído o DNA alvo pode estar degradada, conter inibidores de reação de qPCR ou até mesmo estar contaminada com microrganismos que irão competir com a amplificação do alvo.
- b) a extração de DNA, já que podem ocorrer possíveis perdas durante o processo devido à eficiência do kit de extração, que varia de acordo com a metodologia;
- c) condições de amplificação como concentração e volume de reagentes, ou até mesmo temperatura de preparo das reações de qPCR (Burns & Valdivia, 2008).

Geralmente, quando um valor de C_q é obtido, a amostra testada é considerada positiva. Entretanto, há uma tendência crescente em se considerar uma amostra negativa quando os valores estiverem acima de um valor de corte arbitrário, ou seja, do LD. Supõe-se que o elevado valor de C_q é gerado por baixas quantidades de material

genético alvo ou pela ligação inespecífica do fluoróforo à dupla-fira de DNA presente na amostra (Burns & Valdivia, 2008).

Para estabelecer o LD é necessária a construção de uma curva-padrão que, dependendo da amostra a ser estudada, pode utilizar moléculas de DNA as quais podem variar de 1 a 10^{10} cópias (Pfaff, 2004). Em relação ao C_q de amplificação, esse ponto de corte corresponde ao ciclo em que a curva de amplificação cruza o *Threshold* da reação. Portanto, de forma geral, as amostras cujas curvas de amplificação apresentam valores de C_q inferiores ao *cut-off* são consideradas positivas, e as com valores superiores, negativas (Nutz et al., 2011; Farmacopeia Europea 7.0).

1.5.1.3.5.1- Curva-padrão

A construção de curva de padrão permite determinar a concentração inicial do DNA alvo da amostra, avaliar a eficiência da reação através do cálculo do *slope*, calcular o coeficiente de correlação (R^2) e a interseção do eixo y. Para isso, é construído um gráfico utilizando os resultados da amplificação de amostras contendo concentrações conhecidas do DNA alvo diluídos de forma seriada. O log de cada concentração conhecida é plotado no eixo x em relação ao C_q correspondente no eixo y (Figura 1.16B) (Life Technologies[®], 2012).

1.5.1.3.5.2- Coeficiente de correlação (R^2)

O coeficiente de correlação (R^2) é uma medida que demonstra a capacidade do valor encontrado no ensaio se correlacionar com o ponto correspondente na curva padrão. O R^2 reflete a linearidade da curva, demonstrando a manutenção de proporcionalidade entre os valores. O R^2 ideal é igual a1, porém geralmente 0,999 é o valor máximo encontrado (Figura 1.16) (Life Technologies[®], 2012).

1.5.1.3.5.3- Interseção do eixo y

O valor de interseção no eixo y corresponde ao limite teórico máximo de detecção de DNA alvo numa amostra, ou o valor de C_q esperado se o menor número de

cópias de DNA alvo representado no eixo x tivesse amplificado significativamente. Apesar da metodologia de qPCR ser capaz de identificar uma única cópia de DNA, é consenso especificar que a quantidade mínima detectável varia de 2 a 10 cópias de DNA. Adicionalmente, esse valor pode ser utilizado para comparar os diferentes sistemas de amplificação e suas amostras com relação à sensibilidade do teste (Figura 1.16) (Life Technologies[®], 2012).

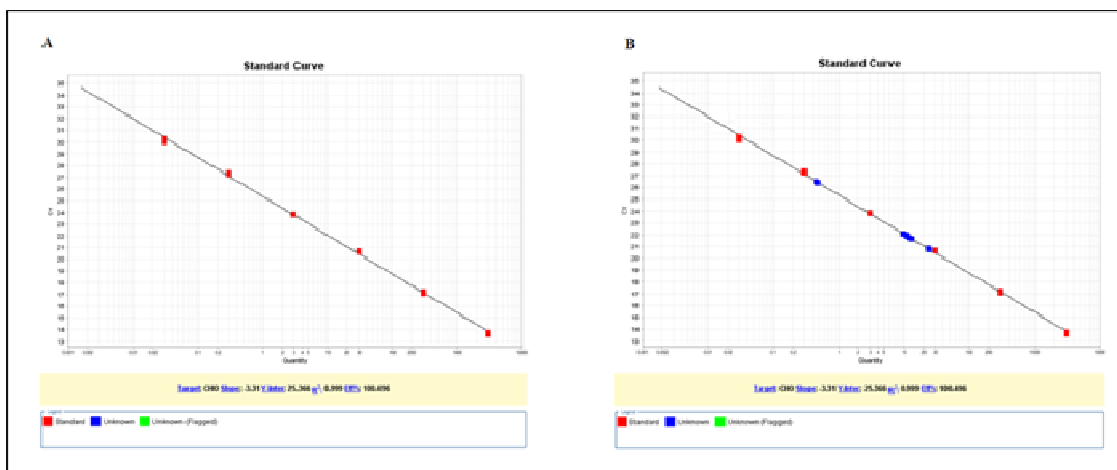


Figura 1.13: Demonstrativo de uma curva padrão de amplificação. A: A partir de uma amostra com concentração inicial de DNA conhecida, foi feita uma diluição seriada para a construção a curva de amplificação apresentando $R^2=0.999$; $Slope=-3,3$; Eficiência= 100,5. **B:** A partir da construção da curva, pode-se calcular a concentração de DNA de amostras desconhecidas. Fonte: Arquivo padrão de amplificação de DNA residual do kit *PrepSEQ™ Residual DNA Sample Preparation* (Life Technologies[®]).

1.6 - Detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* em Bio-Manguinhos

A detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* é feita atualmente na SETBI através da PCR convencional multiplex a qual utiliza um conjunto de 9 iniciadores que amplificam o *locus* 16S ribossomal (16S rDNA), pois esta é uma região conservada entre esses microrganismos (Uphoff; Drexler, 2002; Kong et al., 2007). Com esses iniciadores é possível detectar apenas 25 espécies de micoplasmas, dentre uma variedade de espécies que poderiam potencialmente contaminar o ambiente laboratorial ou os produtos produzidos por Bio-Manguinhos.

De forma a atender as exigências de qualidade requeridas pela ANVISA e OMS, e considerando os avanços tecnológicos principalmente em ensaios biomoleculares, se faz necessária a melhoria do teste de detecção dos microrganismos pertencentes à classe *Mollicutes*.

Até o momento, não existe disponível na literatura um ensaio de qPCR que seja capaz de detectar todas as espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* conforme preconizado pela FE 7.0. Entretanto, no mercado está disponível o kit comercial *Mycoseq*[®] da Life Technologies[®], que detecta *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* por qPCR através do sistema de detecção SYBR[®] Green. Este produto é capaz de detectar até 0,4 UFC destes microrganismos, além de ter sido validado para uso industrial (Life Technologies, 2010). Em contrapartida, foi possível analisar apenas 100 amostras por cada unidade de kit, que possui um custo elevado para a unidade. Adicionalmente, apesar do certificado de validação externa, existe a necessidade da validação interna, em que os ensaios serão realizados por cada produto. O exposto acima tornaria inviável a adoção do kit na rotina de controle de qualidade.

Considerando a importância de Bio-Manguinhos na produção de imunobiológicos para fornecimento ao PNI e internacionalmente, o presente estudo tem como objetivo desenvolver *in house* um protocolo de qPCR otimizado para a detecção molecular de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* em insumos, produtos intermediários e PAG da VFA, e em PAC da vacina de sarampo, caxumba e rubéola, o qual atuará em conjunto com o método de cultivo. Esta melhoria permitirá maior abrangência de espécies, rapidez, praticidade, segurança e eficiência no diagnóstico por este método.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral:

- ✓ Desenvolver uma metodologia de qPCR *in house* para a detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* visando a melhoria da atual técnica utilizada na SETBI aplicada a imunobiológicos e insumos de processos de Bio-Manguinhos.

2.2- Objetivos específicos:

- ✓ Prospectar um conjunto de iniciadores específicos para detecção de *Mycoplasma* sp. e *A.laidlawii* recomendadas pela FE;
- ✓ Otimizar as reações de qPCR *in house* para detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*;
- ✓ Avaliar a especificidade dos iniciadores *in silico* e *in vitro*, utilizando bactérias filogeneticamente próximas às bactérias da classe *Mollicutes* preconizadas pela FE 7.0;
- ✓ Avaliar a capacidade dos diferentes conjuntos de iniciadores de detectar, de forma cruzada, as espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*.
- ✓ Avaliar a capacidade dos iniciadores prospectados de detectar outras espécies de *Mycoplasma* sp. além daquelas recomendadas pela FE 7.0.
- ✓ Estabelecer a sensibilidade analítica dos ensaios de qPCR *in house* através da determinação do LD para as espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*;

- ✓ Estabelecer uma faixa de T_m para cada espécie de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*;
- ✓ Avaliar a interferência das matrizes de imunobiológicos e insumos de processos produzidos por Bio-Manguinhos na detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* por qPCR *in house*;
- ✓ Avaliar a influência dos kits de extração *Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System* (Promega[®]) e *PrepSEQ[™] Nucleic Acid Extraction Kit* (Life Technologies[®]) na detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* em imunobiológicos por qPCR *in house*;
- ✓ Comparar o desempenho da qPCR *in house* na detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* com a PCR convencional multiplex atualmente utilizada na SETBI e o kit *MycoSEQ[®]* (Life Technologies[®]);

3- METODOLOGIA

3.1- Seleção dos microrganismos

As cepas recomendadas pela FE para a validação de técnicas NAT que detectam micoplasmas foram obtidas da *American Type Culture Collection* ATCC® e *National Collection of Type Cultures* NCTC®: *M. gallisepticum* (ATCC 19610), *M. orale* (ATCC 23714), *M. synoviae* (ATCC 25204), *M. pneumoniae* (ATCC 15492), *M. fermentans* (ATCC 19989), *M. arginini* (ATCC 23838) e *A. laidlawii* (ATCC 14089). Além disso, para os ensaios de especificidade, são preconizados testes com bactérias filogeneticamente próximas ao gênero *Mycoplasma*: *Streptococcus pyogenes* (ATCC 14089) *Clostridium sporogenes* (NCTC 12696) e *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 11437).

A recuperação das cepas foi feita na Seção de Esterilidade, Processamento e Insumos (SEPIN), área também pertencente ao LACOM, por crescimento em caldo Frey (*M. synoviae*) e Hayflick (demais espécies de micoplasmas) fornecidos pelo Setor de Meios de Cultivo (SEMEC) / LACOM, com percentual de oxigênio e temperatura adequados para cada uma. Após o cultivo, que varia de 7 a 35 dias, foi realizada a contagem bacteriana em placa utilizando microscópio óptico, sendo uma parte de cada uma das culturas distribuída em garrafas estéreis de capacidade de 500 mL na concentração encontrada após a contagem, e a outra em alíquotas de 1 mL, na concentração de 1000 UFC/mL, em microtubos (Axygen®) previamente identificados, dentro da cabine de segurança biológica.

3.2- Extração de DNA

O DNA utilizado nos ensaios de qPCR com o protocolo *in house* e com o kit *MycoSEQ*® (Life Technologies®) foi extraído a partir do cultivo direto dos micoplasmas, de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus*, com o kit comercial *PrepSEQ*™ *Nucleic Acid Extraction Kit* (Life Technologies®), parte integrante do *MycoSEQ*® (Life Technologies®) para a extração de DNA, conforme as orientações do fabricante.

Para a avaliação da interferência da matriz dos imunobiológicos e insumos de processos, além do kit *PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit* (Life Technologies®), foi também adotado o kit comercial *Wizard® SV Genomic DNA Purification System* (Promega®), de acordo com as orientações descritas na Diretriz Interna (DI) 1245 adotada pelo SETBI para a extração de DNA. Este kit foi usado com o intuito de avaliar a capacidade do kit *Mycoseq®* (Life Technologies®) de detectar os micoplasmas mesmo com o DNA extraído a partir de outro kit que não o recomendado e para comparar a eficiência entre os dois kits de extração.

Após a extração, o DNA foi armazenado a -20 °C em alíquotas de 40 µL em microtubos de 1,5 mL (Axygen®) para evitar repetidos eventos de congelamento e descongelamento que poderiam comprometer a qualidade do material.

3.3- Prospecção dos iniciadores

A prospecção dos iniciadores foi realizada utilizando as sequências genômicas do *locus* 16S ribossomal (16S rDNA) das espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* descritas em 3.1, as quais foram selecionadas no banco de dados *online* GenBank® (*Basic Local Alignment Search Tool*- NCBI®) e alinhadas através da ferramenta *online* Clustal Omega (EMBL-EBI®) para a seleção de regiões compartilhadas entre esses microrganismos.

Após a escolha destas regiões, os iniciadores foram selecionados e avaliados *in silico* com o programa IDT OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies®) em relação aos seguintes parâmetros: tamanho, a previsão da temperatura de dissociação (do inglês *melting temperature* - T_m), conteúdo CG e a energia necessária para a formação de alças e dímeros. Paralelamente, foi avaliado tamanho do produto de qPCR que seria amplificado para não ultrapassar 200 pb, pois isso favorece o alcance de 100% de eficiência da reação, principalmente quando se utiliza o sistema de detecção de SYBR® Green. Além disso, os fragmentos candidatos foram selecionados de forma a não conterem bases púricas e pirimídicas iguais repetidas em sequência, pois estas aumentam a chance de formação de dímeros (Saiki, 1989; Raymaekers et al., 2009; Life Technologies®, 2012).

Além do cumprimento dos requisitos acima destacados, os iniciadores devem ser específicos para *Mycoplasma*, e para isso, as regiões selecionadas do 16S rDNA das oito espécies preconizadas pela FE 7.0 foram também alinhadas com as sequências do mesmo *locus* de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus* obtidas no GenBank® (NCBI®), sendo excluídas aquelas encontradas em comum.

Após a prospecção e a seleção dos iniciadores que seriam avaliados *in vitro*, foi realizada uma busca na ferramenta *online* BLASTn[®] (NCBI[®]) para verificar a existência de outras espécies de micoplasmas que também poderiam ser detectadas pelos oligonucleotídeos, contribuindo assim para o aumento da cobertura de microrganismos, ou para descobrir possíveis pareamentos indesejáveis com outras bactérias que prejudicariam a especificidade dos ensaios.

3.4- Reconstituição dos iniciadores

Os iniciadores foram fabricados pela empresa Life Technologies[®] contendo 130.000 pmol sob a forma liofilizada. Estes foram reconstituídos com 650 μ L de Tampão TE pH 8,0 (Life Technologies[®]), deixando-os na concentração de estoque de 200 η M/ μ L.

A concentração da solução de trabalho adotada para a padronização da qPCR *in house* foi de 10 η M/ μ L, e para os ensaios multiplex de 80 η M/ μ L, conforme descrito na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição das soluções de trabalho dos iniciadores utilizados nos ensaios de qPCR com o protocolo *in house*.

Solução de trabalho (η mol/ μ L)	Composição	
	Solução estoque (200 η mol/ μ L)	Água de injeção
10	12,5 μ L	237,5 μ L
80	40 μ L	60 μ L

3.5- Reações de qPCR

Os testes de qPCR com o protocolo *in house* e com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) foram executados no aparelho 7500 Fast Real-Time[®] (Life Technologies[®]), que possui pacote de calibração e qualificação regularmente atualizado, utilizando o sistema de detecção SYBR[®] Green (Life Technologies[®]) e perfil de amplificação conforme o descrito na Tabela 3.2. O *Threshold* foi fixado automaticamente em 0,2 pelo programa *AccuSEQ*[®] (Life Technologies[®]) em que os ensaios de qPCR foram realizados.

Os ensaios com o protocolo *in house* foram realizados com volume final de 10 μ L, utilizando 5 μ L de SYBR[®] Green 2X (Life Technologies[®]), 1 μ L de amostra teste ou água, iniciadores em concentração a ser definida e água de injeção para completar o volume (Tabela 3.3). Este volume foi limitado a 10 μ L devido à quantidade de reagente disponível, além de ser uma quantidade rotineiramente utilizada em reações de qPCR (Matsuki et al., 2004).

Tabela 3.2: Perfil de amplificação adotado para as reações de qPCR com o protocolo *in house* e com o kit *MycoSEQ*[®].

Etapa da qPCR	Temperatura	Tempo (min.)	Número de ciclos
Desnaturação	95°C	10:00	1
Desnaturação	95°C	00:15	40
Pareamento e extensão	60°C	01:00	
Curva de dissociação	95°C	00:15	1
	60°C	01:00	1

As reações do kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) foram preparadas com volume final de 15µL, contendo 7,5µL de Power SYBR[®] Green Master Mix 2X, 1,5µL de Mycoplasma Real Time Master Mix 10X, de 1 a 5 µL de amostra teste e controle negativo (água) para completar o volume (Tabelas 3.4 e 3.5). Para o controle positivo de reação, 2 µL de controle positivo do kit *MycoSEQ*[™] *Discriminatory Positive Control*- DPC (1000 cópias/µL) foi adicionado como a amostra.

O preparo das reações de ambos os protocolos foi feito em temperatura ambiente, conforme permitido pelos fabricantes dos reagentes.

Tabela 3.3: Composição das reações do protocolo *in house*.

Reagentes	Quantidade (1 reação)
Água livre de nucleases	A completar
Solução SYBR Green Master Mix 2X	5 µL
Iniciador senso 10 pmol/mL	A definir*
Iniciador anti-senso 10 pmol/mL	A definir*
Total Mix	9 µL
DNA ou água (controle negativo)	1 µL
Total	10 µL

* volume a ser definido nos ensaios de otimização.

Tabela 3.4: Composição do premix utilizado nas reações do kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]).

Reagentes	Quantidade (1 reação)
Power SYBR [®] Green Master Mix 2X	7,5 µL
Mycoplasma Real Time Master Mix 10X	1,5µL
Total Premix	9 µL

Tabela 3.5: Composição das reações do kit *Mycoseq*[®] (Life Technologies[®]).

Reações	Composição (vol. final 15 µL)			
	Pré-mix	Amostra teste	Controle negativo (água)	Controle positivo
Controle negativo	9 µL	-	6 µL	-
Amostra teste	9 µL	1 µL	5 µL	-
Controle positivo	9 µL	-	4 µL	2 µL

3.5.1- Otimização de concentração de iniciadores

Em reações de amplificação por qPCR com o mix de SYBR[®] Green (Life Technologies) não há a necessidade do estabelecimento das concentrações ideais de cloreto de magnésio e de outros componentes do mix de uma PCR, uma vez que a própria solução com o fluoróforo já é fornecida com todas as proporções otimizadas para a reação (Life Technologies, 2015a).

Apesar de ser recomendada a otimização da temperatura ideal de anelamento dos iniciadores (Bustin et al., 2009), esta foi mantida em 60 °C pois está é a temperatura ótima de funcionamento da enzima *AmpliTaq*[®] *Fast DNA Polymerase* (Life Tencnologies, 2015b).

Para o estabelecimento das reações de qPCR *in house*, as concentrações de 1 µM, 800 nM, 600 nM, 400 nM e 200 nM de um par de iniciadores prospectado foram testadas para a detecção de 25, 5 e 0,5 UFC do microrganismo alvo, em duplicata, conforme a figura 3.1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25	25	5	5	0,5	0,5		M1				
B	25	25	5	5	0,5	0,5		M2				
C	25	25	5	5	0,5	0,5		M3				
D	25	25	5	5	0,5	0,5		M4				
E	25	25	5	5	0,5	0,5		M5				
F												
G												
H												

Figura 3.1: Modelo de reação para otimização de concentração dos iniciadores das reações de qPCR *in house* utilizando 25, 5 e 0,5 UFC de um microrganismo alvo. Legenda: M1 a M5- controle negativo de amplificação com 1 µM, 800 nM, 600 nM, 400 nM e 200 nM de iniciadores, respectivamente;

Foi escolhida a maior concentração de oligonucleotídeos que poderiam ser utilizados na reação de qPCR *in house* sem que houvesse a formação de dímeros com a T_m próxima a do produto específico alvo, com C_q abaixo de 35 e com valor de ΔRn igual ou superior ao do produto específico.

A partir dos resultados obtidos, as duas maiores concentrações que obedeceram os critérios acima seriam testadas com os outros conjuntos de oligonucleotídeos da qPCR *in house*, de forma a otimizar gastos e tempo.

3.5.2- Ensaios de especificidade

3.5.2.1- Análise *in silico*

A especificidade dos pares de iniciadores prospectados foi avaliada *in silico* na ferramenta *online* BLASTn[®] (NCBI[®]) através da análise do percentual de similaridade entre eles e as sequências genômicas publicadas no GenBank[®] (NCBI[®]) da região 16S rDNA pertencentes às bactérias do gênero *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Clostridium* sp., as quais são recomendadas pela FE 7.0 para esse tipo de ensaio, pois são microrganismos filogeneticamente relacionados às espécies de *Mycoplasma* sp. e *A.laidlawii*.

3.5.2.2- Ensaios *in vitro*

3.5.2.2.1- Ensaios com *M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae*

Os ensaios de especificidade *in vitro* por qPCR com protocolo *in house* para detecção de micoplasmas foram realizados conforme a figura 3.2 utilizando os iniciadores na concentração estabelecida nos ensaios de otimização e 1 μ L de DNA extraído na concentração correspondente a 100 UFC/ μ L, de cultura pura de *S. pyogenes*, *L. acidophilus* e *C. sporogenes*, em triplicata. Além disso, foi testado um *pool* dessas três espécies com DNA totalizando o correspondente a 100 UFC. Como controle positivo de reação para o protocolo *in house* foi utilizado, em duplicata, 1 μ L de DNA extraído de cultura pura de um dos micoplasmas específicos para cada conjunto de iniciador (*M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae*), em concentrações diversas acima de 10 UFC/ μ L.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Strep	Strep	Strep		Strep	Strep	Strep					
B	Lact	Lact	Lact		Lact	Lact	Lact					
C	Clost	Clost	Clost		Clost	Clost	Clost					
D	Pool	Pool	Pool		Pool	Pool	Pool					
E												
F	MO	MO			MG	MG						
G												
H	CE	M1			CE	M2						

Figura 3.2: Ensaio de qPCR para avaliação de especificidade de *M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae*. O DNA correspondente a 100 UFC de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus* foi testado, individualmente e em triplicata, por qPCR utilizando os iniciadores prospectados para a avaliação de especificidade. Legenda: Strep: *S. pyogenes*; Lact: *L. acidophilus*; Clostr: *C. sporogenes*; Pool: DNA de *S. pyogenes*, *L. acidophilus* e *C. sporogenes* totalizando 100 UFC; MO: *M. orale*; MG: *M. gallisepticum*; CE: controle extração de extração; M1: controle negativo de qPCR do mix 1 contendo iniciadores específicos para *M. orale*; M2: controle negativo de qPCR do mix 2 contendo iniciadores específicos para *M. gallisepticum*.

3.5.2.2.2- Ensaio com *A. laidlawii*

Para a escolha do melhor conjunto de oligonucleotídeos para a espécie *A. laidlawii*, foi realizado um ensaio preliminar de amplificação de 5 UFC desta bactéria e de 100 UFC de *S. pyogenes*, *L. acidophilus* e *C. sporogenes*, em duplicata, com os iniciadores na concentração de 600 nM (Figura 3.3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Strep	Strep		Strep	Strep		Strep	Strep		Strep	Strep	
B	Lact	Lact		Lact	Lact		Lact	Lact		Lact	Lact	
C	Clost	Clost		Clost	Clost		Clost	Clost		Clost	Clost	
D												
E	AL	AL		AL	AL		AL	AL		AL	AL	
F												
G												
H	CE	M1		CE	M2		CE	M3		CE	M4	

Figura 3.3: Ensaio preliminar de qPCR para avaliação de especificidade dos iniciadores para a detecção de *A. laidlawii*. Legenda: Strep: *S. pyogenes*; Lact: *L. acidophilus*; Clostr: *C. sporogenes*; AL: *A. laidlawii*; CE: controle negativo de extração; M1 a M4: controle negativo de amplificação dos quatro mixes preparados com diferentes conjuntos de iniciadores.

Os dois melhores conjuntos foram selecionados de acordo com a capacidade de detectar *A. laidlawii* com menores valores de C_q e com formação de picos únicos durante a análise da curva de dissociação. Além disso, nos ensaios com as três bactérias filogeneticamente próximas aos micoplasmas foram considerados os melhores pares de iniciadores os que apresentaram maiores valores de C_q e ausência de picos, ou presença de picos inespecíficos, durante a análise da curva de dissociação.

Em seguida, foi realizado um ensaio multiplex para a escolha do par de iniciadores de *A. laidlawii* utilizando DNA correspondente a 5 UFC de *A. laidlawii* e 100 UFC de *S. pyogenes*, *L. acidophilus* e *C. sporogenes*, em duplicata, juntamente com os outros iniciadores prospectados para o restante das espécies de *Mycoplasma* sp. recomendadas pela FE 7.0 (Figura 3.4).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Strep	Strep		Strep	Strep							
B	Lact	Lact		Lact	Lact							
C	Clost	Clost		Clost	Clost							
D												
E	AL	AL		AL	AL							
F												
G												
H	CE	M1		CE	M2							

Figura 3.4: Ensaio multiplex para a escolha dos iniciadores para a detecção de *A. laidlawii* por qPCR *in house*. Legenda: Strep: *S. pyogenes*; Lact: *L. acidophilus*; Clostr: *C. sporogenes*; AL: *A. laidlawii*; CE: controle negativo de extração; M1 e M2: controle negativo de amplificação dos dois mixes preparados com diferentes conjuntos de iniciadores.

3.5.2.2.3- Ensaios de exclusividade

Além disso, foram realizados testes de exclusividade, em que foi avaliada a capacidade de cada par de iniciadores de detectar, de forma cruzada, as espécies de micoplasmas recomendadas pela FE 7.0 para os quais estes não haviam sido desenhados especificamente (Figura 3.5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MO	MO	MO		MG	MG	MG		AL	AL	AL	
B	MS	MS	MS		MP	MP	MP					
C												M1
D												
E	MO	MO	MO		MG	MG	MG		AL	AL	AL	
F	MS	MS	MS		MP	MP	MP					
G												
H												M2

Figura 3.5: Modelo de ensaio de qPCR *in house* para avaliação de reação cruzada entre dois conjuntos de iniciadores do protocolo *in house* e cinco espécies de micoplasmas. Legenda: MO: *M. orale*; MS: *M. synoviae*; MG: *M. gallisepticum*; MP: *M. pneumoniae*; AL: *A. laidlawii*; M1 e M2: controle negativo de qPCR do mix 1 e 2, que contém diferentes pares de iniciadores, respectivamente.

A especificidade dos iniciadores desenhados para a qPCR *in house* foi determinada *in vitro* frente à ausência de amplificação ou formação de produto inespecífico, por análise de C_q e T_m .

3.5.3- Ensaios de Limite de Detecção (LD)

3.5.3.1- Obtenção de controles positivos

A obtenção dos controles positivos de cada um dos sete *Mycoplasma* foi realizada no Laboratório de Tecnologia do DNA Recombinante (LATER) de Bio-Manguinhos.

O sistema de vetor plasmidial *pGEM[®]-T Easy Vector Systems I* (Promega[®]) foi utilizado, conforme orientação do fabricante, para a introdução do inserto correspondente às sequências gênicas do *locus* 16S rDNA de cada um dos microrganismos utilizadas para o desenho dos iniciadores.

O DNA extraído de cada *Mycoplasma* foi amplificado com os iniciadores prospectados por PCR convencional no aparelho *GeneAmp[®] PCR System 9700* (Applied Biosystems[®]), em volume de 25 μ L, contendo: 1X *Coloress Go-Taq[®] Flexi Buffer* (5X *Coloress Go-Taq[®] Flexi Buffer*, Promega[®]), 2 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$ 25mM, Promega[®]), 200 μ M de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP- 100 mM Invitrogen[®]),

1 pmol/μL dos iniciadores e 0,5 U de *Go-Taq*[®] DNA Polimerase (5 U/μL de *Go-Taq*[®] DNA Polimerase, Promega[®]) (Tabela 3.7).

Tabela 3.6: Composição das reações de PCR para clonagem.

Reagentes	Quantidade (1 reação)
Água livre de nucleases	5,9 μL
5X Colores Go-Taq [®] Flexi Buffer	5 μL
MgCl ₂ 25 mM	2 μL
Mistura de dNTP's 10mM	2 μL
Iniciador senso 10 pmol/mL	2,5 μL
Iniciador anti-senso 10 pmol/mL	2,5 μL
5 U/μL de Go-Taq [®] DNA Polimerase	0,1 μL
Total Mix	20 μL
DNA ou água (controle negativo)	5 μL
Total	25 μL

O perfil térmico adotado para a PCR convencional foi: 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos; 72 °C por 10 minutos. Posteriormente, 5μL dos produtos foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 4% a 100 V por 40 minutos, corado com 6 μL de 10000 X GelRed[™] (Uniscience[®]) aplicado diretamente na matriz.

A purificação dos produtos de PCR foi feita com o kit *Wizard*[®] *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega[®]), e quantificados por fluorimetria com *Qubit*[®] *dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies[®]), conforme instruções dos fabricantes. A quantidade necessária de produto de PCR para as reações de ligação foi calculada de acordo com a fórmula abaixo, na razão inserto:vetor de 3:1 (Figura 3.6).

$$\eta\text{g do inserto} = \frac{\eta\text{g do vetor} \times \text{kb do inserto} \times \text{razão inserto:vetor}}{\text{kb do vetor}}$$

Figura 3.6: Fórmula para cálculo da massa do inserto para realizar a clonagem.

A etapa de transformação foi realizada em bactéria *E. coli* TOP10 eletrocompetente (Life Technologies[®]) através de eletroporação em eletroporador Micropulser[™] da Biorad – Cuveta 0,2 cm/programa Ec2 – e plaqueadas em 20 mL de meio de cultura S.O.C. aditado com 10 μg/mL de amplicilina, 0.5 mM de IPTG e 80 μg/mL de X-Gal (100 mg 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactosidase em 2mL de N,N'-dimetil-formamida).

As colônias brancas foram coletadas com ponteira estéril e ressuspensas em 20 µL de água estéril, dos quais 5 µL foram utilizados para a confirmação da clonagem por PCR de colônia, e 10 µL para o cultivo em 8 mL de meio S.O.C. com 100 mg/mL de ampicilina por 16 horas sob agitação de 200 rpm a 37 °C.

O DNA plasmidial dos clones positivos foram isolados de 8 mL do cultivo pelo kit *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche®) e quantificados por fluorimetria. Para a confirmação da orientação do inserto, 100 ng de DNA plasmidial foi utilizado para a reação de sequenciamento realizada no 3500 xL *Genetic Analyzer* (Life Technologies®) com *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies®). Os 2 mL restantes foram distribuídos em alíquotas para congelamento rápido em nitrogênio líquido e posterior estoque a - 80 °C.

Um dos clones positivos sequenciados de algumas espécies de *Mycoplasma* sp. foi selecionado para o cultivo em 100 mL a 37 °C por 16 horas, sob agitação de 200 rpm, para a obtenção de grande quantidade de massa plasmidial, que foi extraída pelo kit *PureYield™ Plasmid Maxiprep System* (Promega®).

Devido à necessidade de linearização dos plasmídeos para a melhora da eficiência da reação, a enzima de restrição *NcoI* (Promega®) foi utilizada de acordo com as instruções do manual, e a confirmação da digestão foi feita através de corrida eletroforética de 2 µL de produto digerido em gel de agarose a 1% a 100V por 40 minutos e corado com solução de GelRed™ 3X (Uniscience®). Após a digestão, os DNA recombinantes foram purificados com o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®), quantificados por fluorimetria e o cálculo do número de cópias/µL foi realizado de acordo com a seguinte fórmula (Figura 3.7):

$$\text{N}^\circ \text{ de cópias}/\mu\text{L} = \frac{\text{DNA (g}/\mu\text{L)} \times 6,022 \times 10^{23} \text{ (moléculas/mol)}}{\text{Comprimento do fragmento (pb)} \times 649}$$

Figura 3.7: Fórmula para cálculo do número de cópias de DNA/µL obtidas após a clonagem.

3.5.3.2- Desenho experimental dos ensaios de LD

O LD foi estabelecido a partir da construção de curvas-padrão com os controles positivos, em cinco replicatas utilizando oito diluições seriadas de fator 10, a partir de 10⁷ cópias de DNA (Figura 3.8).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MA 10 ⁷	MA 10 ⁷	MA 10 ⁷	MA 10 ⁷	MA 10 ⁷	MA 10 ⁶	MA 10 ⁶	MA 10 ⁶	MA 10 ⁶	MA 10 ⁶		
B	MA 10 ⁵	MA 10 ⁵	MA 10 ⁵	MA 10 ⁵	MA 10 ⁵	MA 10 ⁴	MA 10 ⁴	MA 10 ⁴	MA 10 ⁴	MA 10 ⁴		
C	MA 10 ³	MA 10 ³	MA 10 ³	MA 10 ³	MA 10 ³	MA 10 ²	MA 10 ²	MA 10 ²	MA 10 ²	MA 10 ²		
D	MA 10 ¹	MA 10 ¹	MA 10 ¹	MA 10 ¹	MA 10 ¹	MA 10 ⁰	MA 10 ⁰	MA 10 ⁰	MA 10 ⁰	MA 10 ⁰		
E												
F												
G												
H												M1

Figura 3.8: Ensaio de LD com *M. arginini* utilizando DNA plasmidial. Legenda: MA: *M. arginini*; M1: controle negativo de amplificação.

Para verificar a relação linear, foram utilizados métodos estatísticos para determinação do coeficiente de correlação (R^2), intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo, os quais foram calculados pelo *software AccuSEQ*[®] (Life Technologies[®]) a partir das curvas-padrão construídas para cada microrganismo nos ensaios de LD. Foi considerado como o critério mínimo aceitável o valor de $R^2 \geq 0,98$ (Brasil, 2003a).

Para estabelecer a faixa específica de T_m de cada espécie de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* amplificada por qPCR *in house*, foi realizado o cálculo da média e desvio-padrão dos valores obtidos em todas as replicatas positivas nos ensaios de LD.

3.5.4- Comparação de desempenho do protocolo de qPCR *in house* com o do kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) e com PCR multiplex convencional

Os ensaios de qPCR *in house* foram realizados a partir de uma curva-padrão com DNA extraído de cultura pura de 25, 10, 2 e 0,4 UFC de *M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae*. e *A. laidlawii*, em triplicata. As mesmas amostras de diluições de DNA utilizadas no ensaio anterior foram testadas, em triplicata, por qPCR com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) (Figura 3.9) e por PCR convencional multiplex com os iniciadores utilizados na rotina da SETBI.

A detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) foi realizada de acordo com os critérios especificados no produto, conforme descrito na tabela 3.8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MOa	MOa	MOa	MOb	MOb	MOb	MOc	MOc	MOc	MOd	MOd	MOd
B												
C											CE	M1
D												
E	MOa	MOa	MOa	MOb	MOb	MOb	MOc	MOc	MOc	MOd	MOd	MOd
F												
G												
H											CE	M2

Figura 3.9: Ensaio de qPCR *in house* e com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) de 25, 10, 2 e 0,4 UFC de *M. orale*. Legenda: MOa: 25 UFC de *M. orale*; MOb: 10 UFC de *M. orale*; MOc: 2 UFC de *M. orale*; MOd: 0,4 UFC de *M. orale*; CE: controle negativo de extração; M1 e 2: controle negativo de qPCR *in house* e do kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]), respectivamente.

Tabela 3.7: Interpretação dos resultados aplicado aos ensaios com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®])
Fonte: [adaptado] Protocolo *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]).

Sinal de fluorescência do SYBR [®] Green	T_m do alvo entre 75 e 85 °C e valor derivativo > 0,1	T_m inespecífico < 75 °C	Resultado
Presente, $C_q < 36$	Presente	Ausente	Positivo
Presente, $C_q < 36$	Presente	Presente	Positivo
Presente, $C_q < 36$	Ausente	Presente	Possivelmente negativo
Presente, mas $C_q > 36$	Presente	Ausente	Possivelmente positivo
Presente, mas $C_q > 36$	Presente	Presente	Possivelmente positivo
Presente, mas $C_q > 36$	Ausente	Ausente	Possivelmente negativo
Presente, mas $C_q > 36$	Ausente	Presente	Possivelmente negativo
Ausente	Ausente	Ausente	Negativo
Ausente	Ausente	Presente	Negativo

3.5.5- Avaliação de interferência de matriz

3.5.5.1- Vacina de Febre Amarela

Alíquotas de 1 mL de suspensão viral (lote 113FSVE010) e PAG (lote 114VFA003) de vacina de febre amarela, livres de contaminação por *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* pelo

método de PCR multiplex convencional implementado na SETBI, foram utilizadas para avaliar a interferência de seus componentes na detecção desses microrganismos por qPCR com o protocolo *in house*.

Parte das alíquotas de cada produto foi contaminada, de forma independente, com cultura pura de *M. orale* e *A. laidlawii*, e juntamente com as alíquotas livres de contaminação, foi realizada a extração de DNA com o kit *PrepSEQ™ Nucleic Acid Extraction Kit* (Life Technologies®), ou com *Wizard® SV Genomic DNA Purification System* (Promega®) - para avaliar a influência do kit de extração nos resultados-, de acordo com as recomendações do fabricante, seguindo o esquema geral abaixo (Figura 3.10):

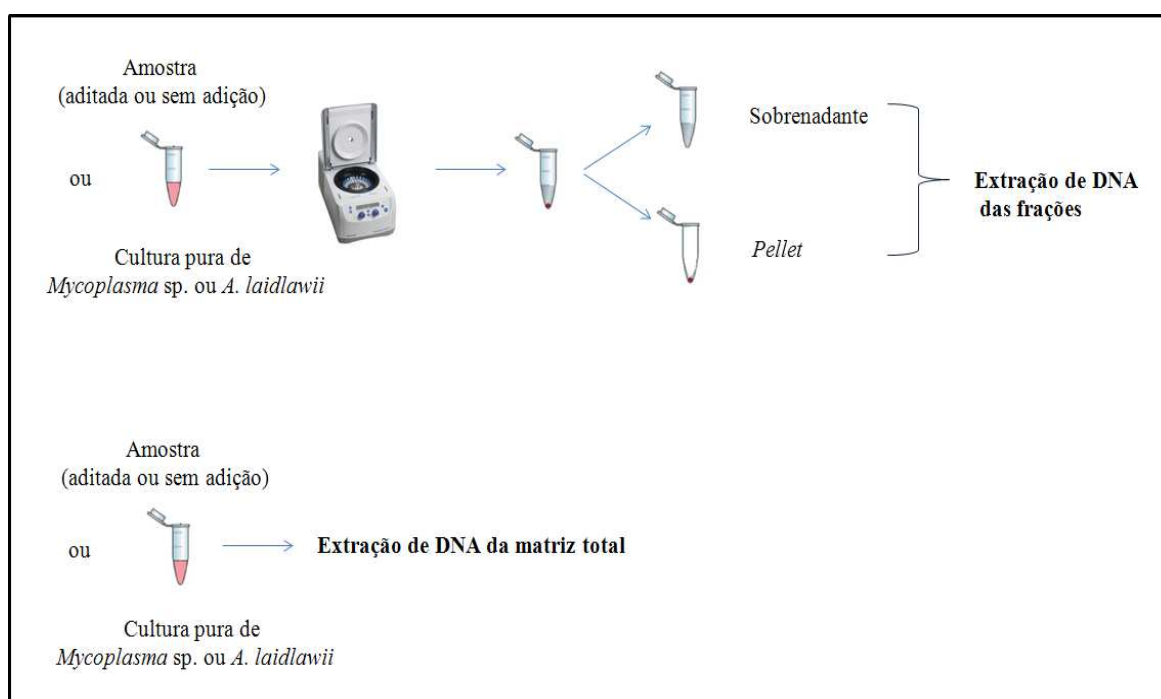


Figura 3.10: Desenho experimental do ensaio para estudo de interferência de matriz.

Antes da extração de DNA, o sobrenadante e *pellet* foram obtidos a partir de centrifugação a 16000 x g por 15 minutos a 4 °C em microcentrífuga *Eppendorf* modelo 5430R. Adicionalmente, além dos ensaios com as frações das amostras, foi também testada a matriz total de suspensão viral, isto é, sem que houvesse a centrifugação após a contaminação, em diferentes volumes (500, 400, 300, 200 e 100 µL).

Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação por qPCR, em duplicata ou triplicata dependendo do ensaio, com os iniciadores do protocolo *in house* conforme descrito nas tabelas 3.3 e 3.4, seguindo o modelo da figura 3.11.

A interferência das matrizes de suspensão viral e PAG foi avaliada de acordo com a ocorrência da inibição da reação de qPCR *in house* através da avaliação dos C_q s obtidos na amplificação da amostra aditada e na mesma quantidade de cultura pura de micoplasma utilizada na contaminação dessa amostra. Além disso, foram analisadas as curvas de dissociação das reações em relação à formação de picos e suas respectivas T_m .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Matriz total	Matriz total	Matriz total		Sobrenadante	Sobrenadante	Sobrenadante		Pellet	Pellet	Pellet	
B												
C	Matriz total aditada	Matriz total aditada	Matriz total aditada		Sobrenadante aditado	Sobrenadante aditado	Sobrenadante aditado		Pellet aditado	Pellet aditado	Pellet aditado	
D												
E	MO	MO	MO		MO sobrenadante	MO sobrenadante	MO sobrenadante		MO pellet	MO pellet	MO pellet	
F												
G												
H											CE	Mix

Figura 3.11: Modelo de placa para ensaio de qPCR em triplicata para avaliação de interferência de matriz total ou das frações (sobrenadante e pellet) de suspensão viral ou PAG. Legenda: MO: *M. orale*; CE: controle negativo de extração e Mix: controle negativo de amplificação.

3.5.5.2- Soro fetal bovino

Duas alíquotas de soro fetal bovino livres de contaminação por *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* foram utilizadas para a avaliação da interferência de sua matriz nos ensaios de qPCR *in house*.

Uma delas foi contaminada com *A. laidlawii*, e juntamente com a alíquota livre de contaminação, foram centrifugadas a 16000 x g por 15 minutos a 4 °C em microcentrífuga Eppendorf Modelo 5430R para obtenção de pellet e posterior extração de DNA com o kit MycoSEQ® (Life Technologies®). Como controle positivo foi utilizado o pellet de cultura pura de *A. laidlawii* na mesma concentração daquela utilizada na contaminação do soro.

O ensaio *in vitro* foi realizado em duplicata, com os iniciadores prospectados para a detecção de *A. laidlawii* por qPCR *in house*, conforme modelo da figura 3.12.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Pellet	Pellet										
B												
C	Pellet aditado	Pellet aditado										
D												
E	AL pellet	AL pellet										
F												
G												
H											CE	Mix

Figura 3.12: Avaliação da interferência do *pellet* de soro fetal bovino na detecção de *A. laidlawii* por qPCR *in house*. Legenda: AL: *A. laidlawii*; CE: controle negativo de extração; Mix: controle negativo de amplificação.

3.6- Análise estatística

Foi realizada a análise descritiva dos dados através do cálculo de média e desvio-padrão no programa Excel (Microsoft[®] Office 2007) para obtenção dos valores médios de C_q e T_m entre as replicatas dos ensaios de qPCR *in house* e com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]).

Para avaliar a eficácia na detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* nos ensaios de comparação entre qPCR com o protocolo *in house* e com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) foi realizada a análise estatística através do teste de Manny- Whitney no programa R versão 2.11.1 (2010-05-31), considerando um intervalo de confiança de 95%.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Prospecção dos iniciadores

A primeira etapa para o desenvolvimento de uma metodologia de qPCR *in house* é a escolha da região alvo a ser amplificada (Raymaekers et al., 2009). A prospecção dos iniciadores envolveu a escolha de uma região apropriada que fosse conservada entre as espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* (Teyssou et al., 1993; Kuppeveld et al., 1994; Gopalkrishna et al., 2007). Dentre alguns marcadores filogenéticos podem se destacar os genes de fator de alongamento EF-Tu (*tuf*) (Kamla et al., 1996; Schneider, 1997), da proteína de choque térmico hsp70 (Falah & Gupta, 1997), de proteínas ribossomais conservadas (Gundersen et al., 1996), além das sequências intergênicas de 16S/23S rDNA (Smart et al., 1996; Harasawa et al., 2000; Chalker & Brownlie, 2004).

Apesar de essas regiões serem conservadas entre as bactérias da classe *Mollicutes*, algumas apresentam variações entre cepas relacionadas (Gundersen et al., 1996; Smart et al., 1996; Kamla et al., 1996; Razin et al., 1998). Para estudos de filogenia, a utilização desses *loci* apresentaria vantagens, já que seria possível diferenciar espécies muito similares (Gundersen et al., 1996; Smart et al., 1996; Kamla et al., 1996; Razin et al., 1998). No entanto, para a prospecção de iniciadores a serem utilizados em uma reação de qPCR, a seleção de um *locus* conservado entre as espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* seria o melhor cenário, uma vez que a utilização de um único par de oligonucleotídeos que pudesse detectar todas as espécies de micoplasmas preconizadas pela FE 7.0 minimizaria a dificuldade de padronização da técnica e implicaria em menores gastos para a sua implementação.

O gene 16S rDNA é um *locus* conservado entre organismos filogeneticamente relacionados como bactérias pertencentes a um mesmo gênero (Woese, 1987; Weisburg et al., 1991; Ludwig et al., 1998; Brown et al., 2007). Dessa forma, essa região é comumente adotada não apenas para estudos de filogenia, mas também como alvo para a detecção de bactérias em amostras clínicas, produtos farmacêuticos ou no ambiente laboratorial (Uphoff & Drexler, 2002; Gopalkrishna et al., 2007; Deutschmann et al., 2010; Tabatabaei-Qomi et al., 2014).

De acordo com as figuras 4.1 a 4.4, foi possível observar várias regiões do 16rDNA em comum entre os micoplasmas que poderiam ser utilizadas para a prospecção dos iniciadores. Apesar da seleção de diversos pares de oligonucleotídeos que apresentavam 100% de similaridade com os micoplasmas, muitos foram descartados após análise *in silico* devido: a) fragmento amplificado maior do que 200 pb (Figura 4.1), b) alta complementariedade entre eles, com a formação de dímeros com mais de quatro ligações entre os iniciadores e/ou com um ΔG abaixo de -9 kcal/mol (Figura 4.2), o que dificultaria a disponibilidade dos iniciadores para a etapa de pareamento ao DNA alvo, tamanho estabelecido na literatura como ideal para uma reação de qPCR, c) formação de alças em temperaturas acima de 37 °C, o que poderia dificultar a ligação entre o iniciador e o DNA e afetar por conseguinte, a eficiência da reação (Figura 4.3), d) diferença de T_m entre eles acima de 5 °C, o que poderia prejudicar a eficiência da reação (Figura 4.4).

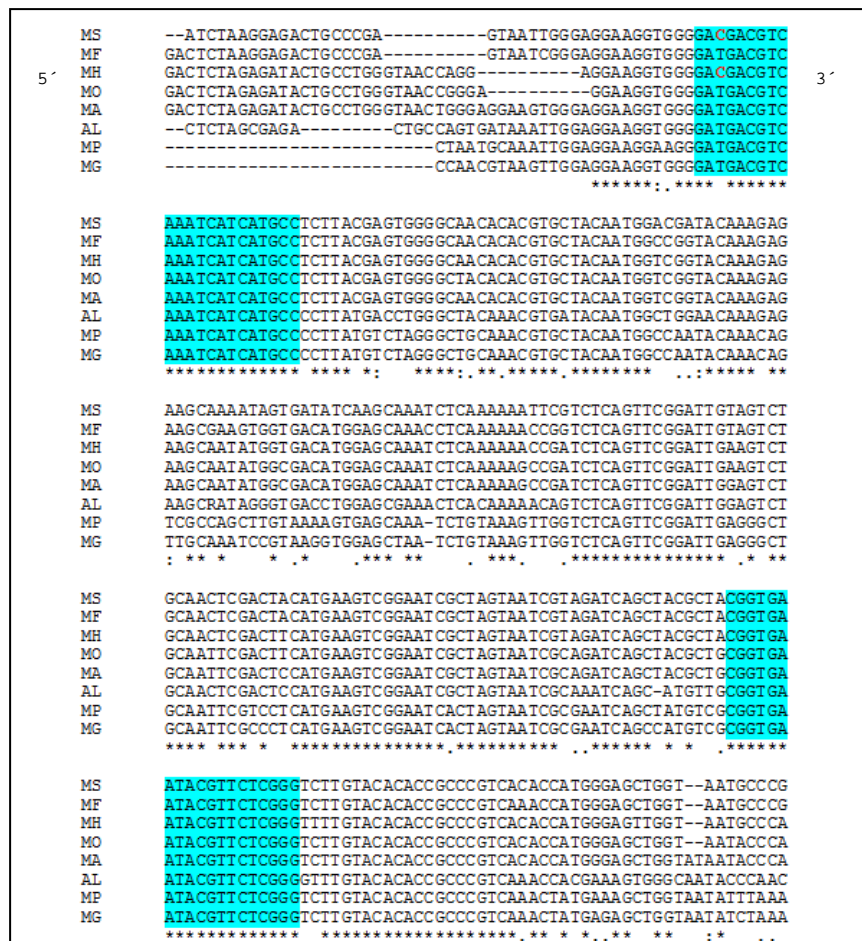


Figura 4.1: Alinhamento da região 16SrDNA (parcial) das sete espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* com fragmento de 203 pb. Destacadas em azul as sequências de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso, e as bases em vermelho representam as regiões do DNA em que o iniciador não se anelaria. Os iniciadores destacados não foram considerados apropriados para a qPCR *in house* devido ao fragmento amplificado ser maior do que 200pb. Legenda: MS: *M. synoviae*, MF: *M. fermentans*, MH: *M. hyorhinis*, MO: *M. orale*, MA: *M. arginini*, AL: *Acholeplasma laidlawii*, MP: *M. pneumoniae*, MG: *M. gallisepticum*.

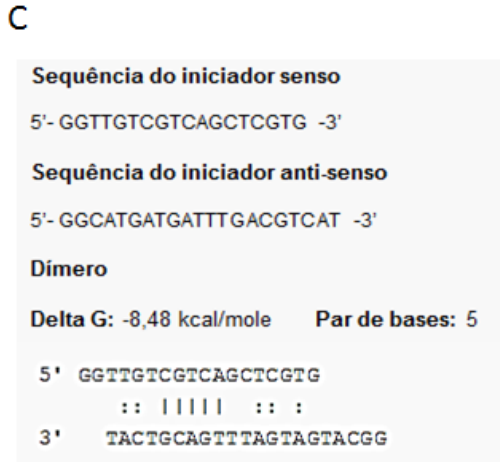
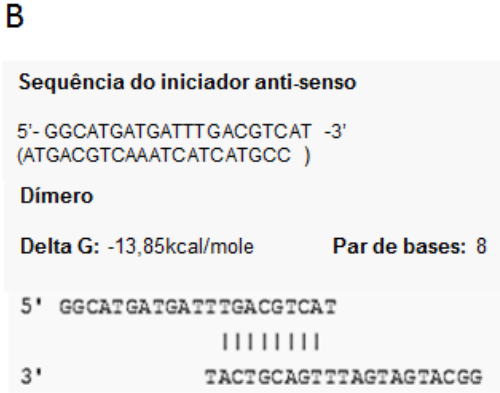
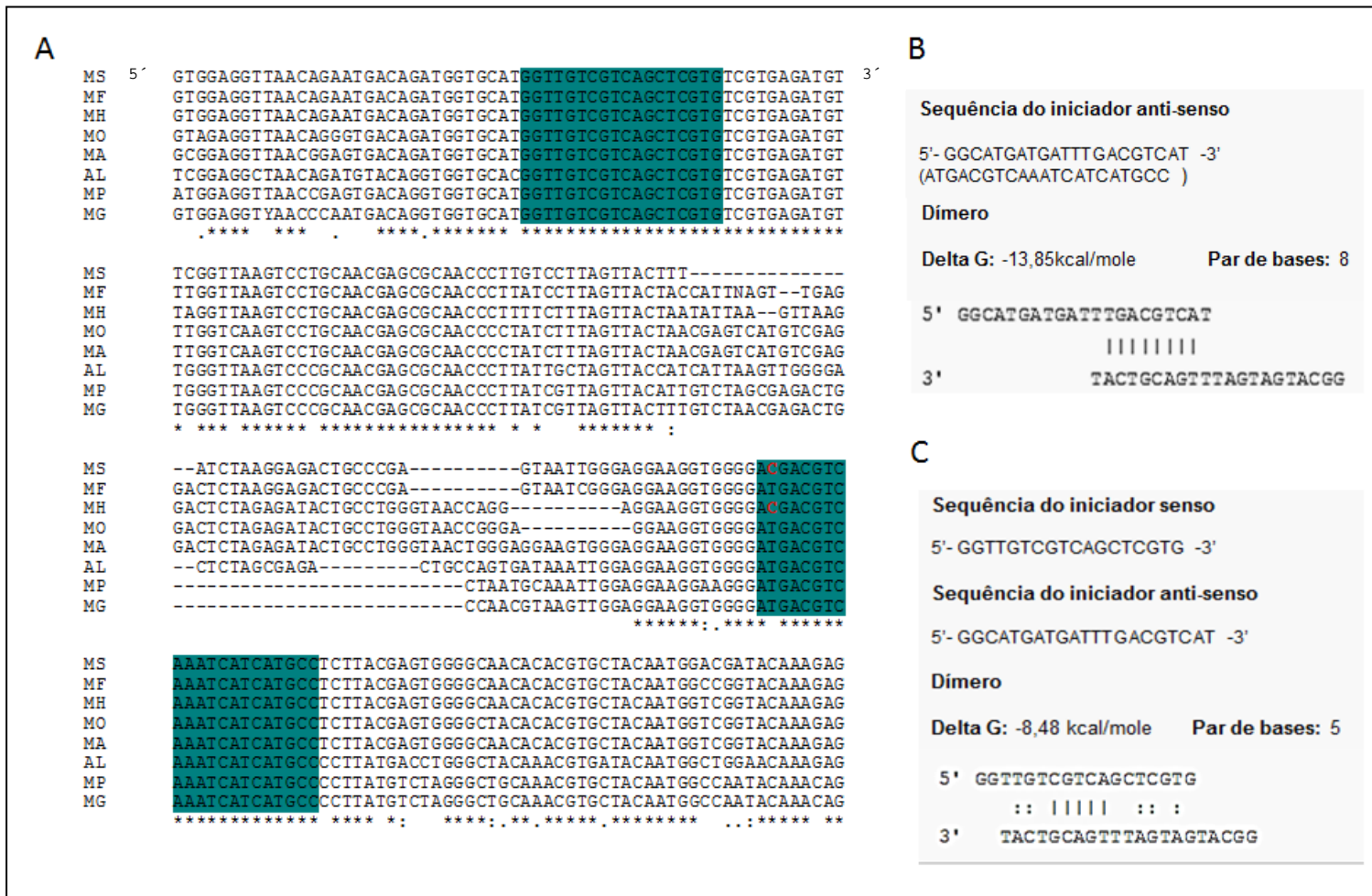


Figura 4.2: Alinhamento da região 16S rDNA (parcial) das sete espécies de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii*. **A:** As sequências destacadas em verde representam os iniciadores senso e anti-senso, e as bases de cor vermelha são os locais onde não ocorreria o pareamento do iniciador à fita de DNA. Os iniciadores destacados não foram considerados apropriados para a qPCR *in house* por formarem dímeros com muitas ligações. **B:** Análise *in silico* do homodímero do iniciador anti-senso, apresentando oito ligações e ΔG com valor inferior a -9 kcal/mol. **C:** Análise *in silico* do heterodímero formado apresentando cinco ligações entre os iniciadores. Legenda: MS: *M. synoviae*, MF: *M. fermentans*, MH: *M. hyorhinae*, MO: *M. orale*, MA: *M. arginini*, AL: *A. laidlawii*, MP: *M. pneumoniae*, MG: *M. gallisepticum*.

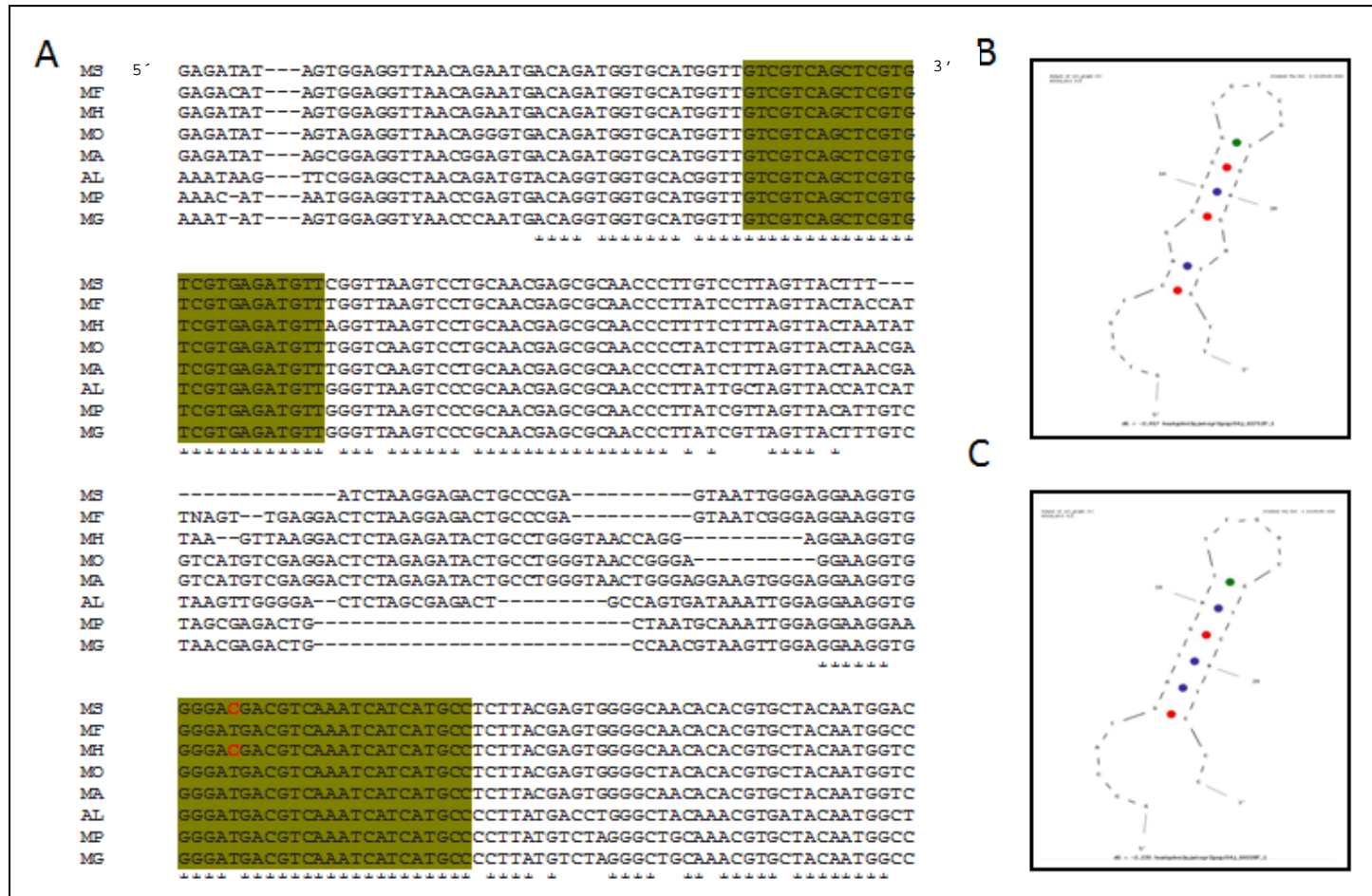


Figura 4.3: Alinhamento (das sequências parciais) da região 16S rDNA das sete espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*. **A:** As sequências destacadas em mostarda representam as regiões de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso e as bases na cor vermelha foram destacadas, pois diferem daquelas presentes no iniciador, e dessa forma, o pareamento na fita de DNA não ocorreria nessa região. Os iniciadores destacados não foram considerados apropriados para a qPCR *in house* por formarem alças em T_m acima de 37 °C. **B:** Alça formada pelo iniciador senso, com previsão de T_m de 40,7 °C. **C:** Alça formada pelo iniciador anti-senso, com previsão de T_m de 41,7 °C. Legenda: MS: *M. synoviae*, MF: *M. fermentans*, MH: *M. hyorhinae*, MO: *M. orale*, MA: *M. arginini*, AL: *A. laidlawii*, MP: *M. pneumoniae*, MG: *M. gallisepticum*.

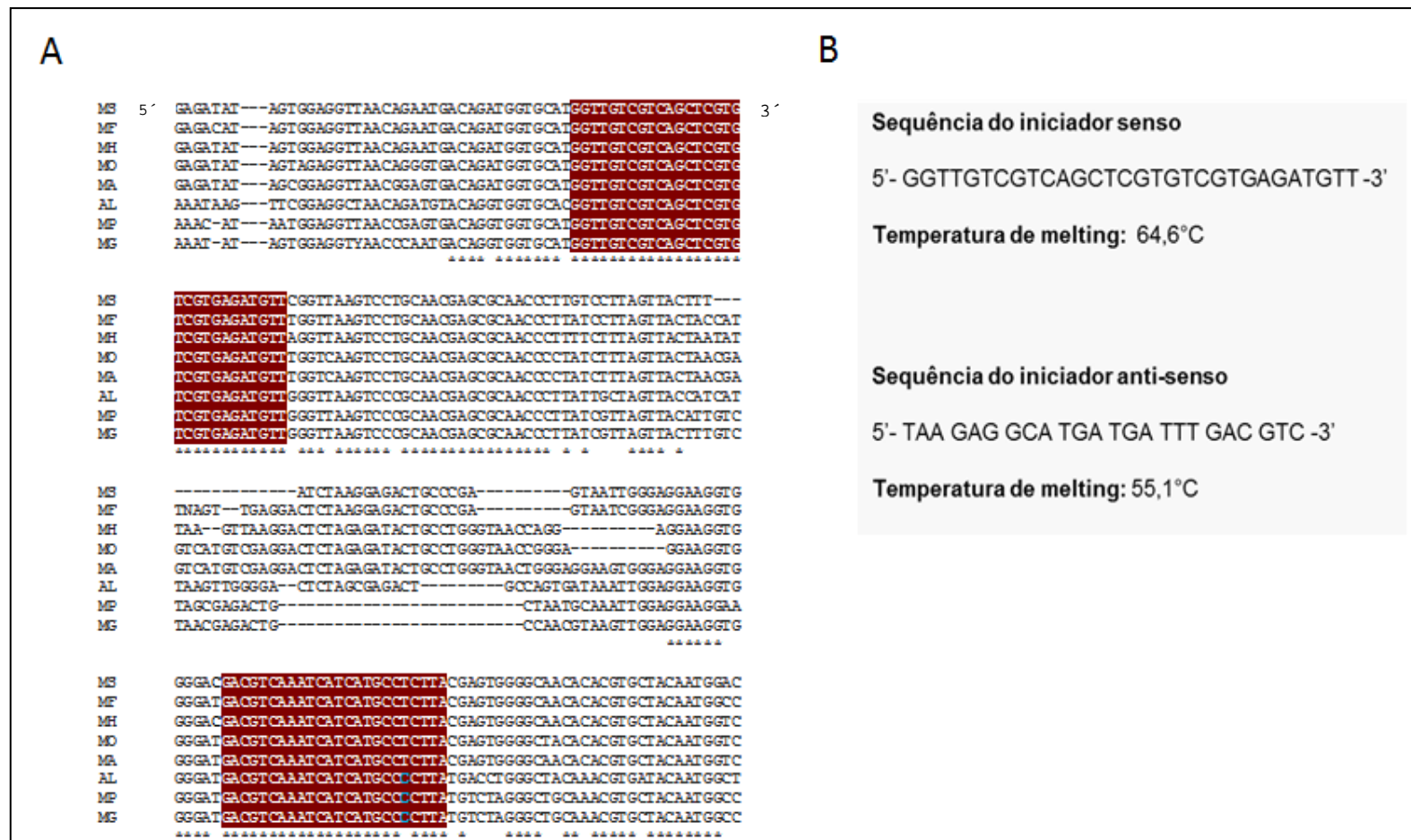


Figura 4.4: Alinhamento (das sequências parciais) da região 16S rDNA das sete espécies de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii*. **A:** As sequências destacadas em vinho representam as regiões de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso e as bases na cor azul foram destacadas pois diferem daquelas presentes no iniciador, e dessa forma, o seu pareamento à fita de DNA não ocorreria nessa região. **B:** Temperaturas de dissociação dos iniciadores senso e anti-senso destacados na figura A e calculados pelo programa OligoAnalyzer 3.1. Os oligonucleotídeos não foram considerados apropriados para a qPCR *in house* por possuírem uma diferença de T_m entre eles acima de 5 °C, o que poderia prejudicar na eficiência da reação. Legenda: MS: *M. synoviae*, MF: *M. fermentans*, MH: *M. hyorhinis*, MO: *M. orale*, MA: *M. arginini*, AL: *A. laidlawii*, MP: *M. pneumoniae*, MG: *M. gallisepticum*.

Após a exclusão dos oligonucleotídeos que não atenderam aos critérios descritos anteriormente, alguns foram pré-selecionados para a análise *in silico* de especificidade. A ferramenta *online* BLASTn[®] (NCBI[®]) foi utilizada para observar o percentual de similaridade entre os iniciadores e as espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus*, as quais não podem ser detectadas num teste NAT para pesquisa de micoplasmas (Farmacopeia Europeia, 2010). Devido à proximidade filogenética entre essas espécies e os micoplasmas (Weisburg et al., 1989; Razin, 2006; Farmacopeia Europeia, 2010), o *locus* 16S rDNA também é uma região conservada entre todos esses microrganismos, e portanto, não foi possível encontrar um único par de iniciadores que pudesse detectar especificamente as sete espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* (Figura 4.5).

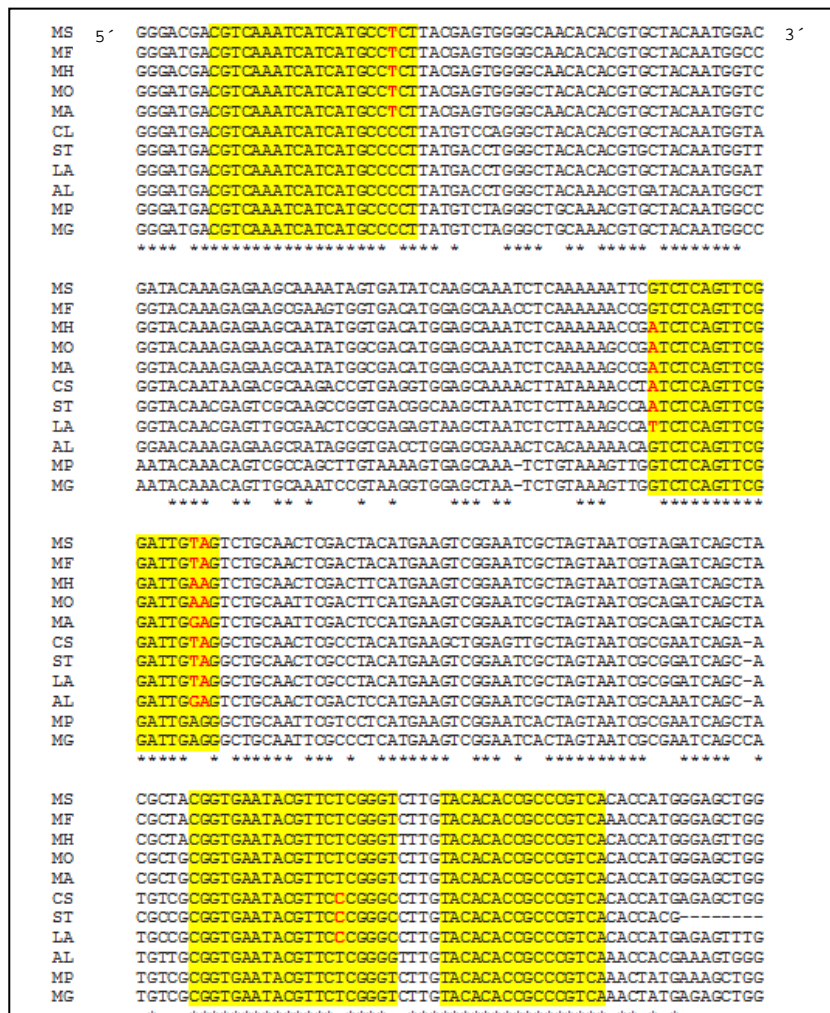


Figura 4.5: Alinhamento da região 16S rDNA (parcial) das sete espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* com *S. pyogenes*. Em destaque em amarelo as regiões de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso e as bases destacadas em vermelho diferem daquelas presentes no iniciador, e dessa forma, o pareamento na fita de DNA não ocorreria nessa região. Os iniciadores destacados não foram considerados apropriados para a qPCR *in house* por apresentarem elevada homologia com *S. pyogenes*, que não pode ser amplificado durante a reação. Legenda: ST: *S. pyogenes*, CL: *C. sporogenes*, LA: *L. acidophilus*, MS: *M. synoviae*, MF: *M. fermentans*, MH: *M. hyorhinae*, MO: *M. orale*, MA: *M. arginini*, AL: *A. laidlawii*, MP: *M. pneumoniae*, MG: *M. gallisepticum*.

A partir do alinhamento da figura 4.5, foi possível verificar que a espécie *A. laidlawii* é a que mais difere dentre os micoplasmas, provavelmente por não pertencer ao mesmo gênero, e sim à mesma classe (Taxonomy ID: 2148) (Razin et al., 1998; Razin, 2006). Por isso, assim como em trabalhos anteriores (Teyssou et al., 1993; Gopalkrishna et al., 2007), foi feito um estudo para a prospecção de um par de iniciadores somente para o *A. laidlawii* e um outro para as sete espécies de *Mycoplasma* sp..

Conforme a figura 4.6, os iniciadores destacados poderiam ter sido escolhidos para o protocolo de qPCR *in house* pois reconheceriam as sete espécies de *Mycoplasma* sp. Entretanto, por possuírem 100% de similaridade com *S. pyogenes* (JN578222- iniciador senso; KJ620886- iniciador anti-senso), eles foram descartados. Mesmo após a seleção de novos oligonucleotídeos com 100% de similaridade com as sete espécies de *Mycoplasma* sp., eles não foram levados a diante por não possuírem todas características estruturais desejáveis e/ou por possuírem, após avaliação da sua especificidade, mais de 85% de similaridade com pelo menos uma das três bactérias filogeneticamente próximas aos micoplasmas e, portanto, elevada probabilidade de amplificá-las.

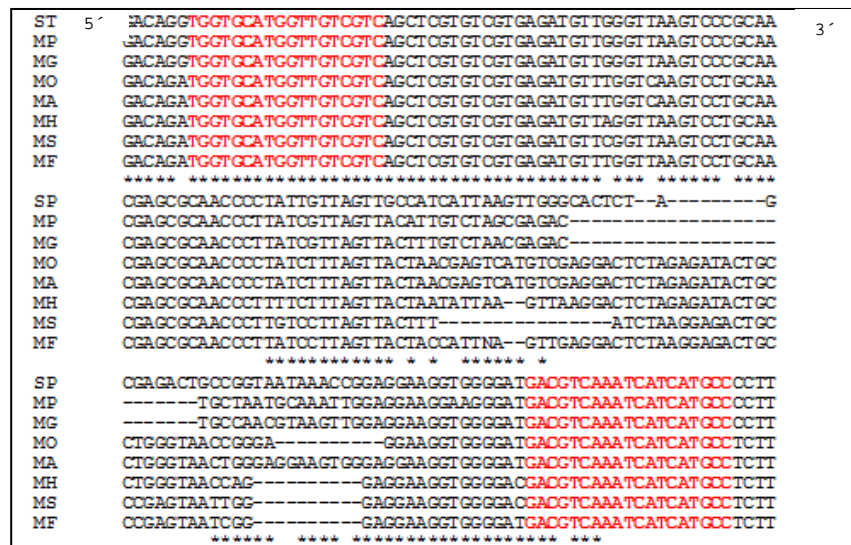


Figura 4.6: Alinhamento da região 16S rDNA (parcial) das sete espécies de *Mycoplasma* sp. Os iniciadores destacados em vermelho não foram considerados apropriados para a qPCR *in house* por apresentarem 100% de similaridade com *S. pyogenes*. Legenda: MS: *M. synoviae*, MF: *M. fermentans*, MH: *M. hyorhinis*, MO: *M. orale*, MA: *M. arginini*, MP: *M. pneumoniae*, MG: *M. gallisepticum*, ST: *S. pyogenes*.

Utilizando novamente o alinhamento da Figura 4.5, foi possível observar que as espécies de *M. pneumoniae* e de *M. gallisepticum* possuíam maior similaridade entre si do que com as demais espécies de *Mycoplasma* sp. (Pettersson, et al., 2000). O mesmo já havia sido descrito por Weisburg et al., 1989, que através do estudo filogenético entre as espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, (exceto *M. synoviae*) separou essas bactérias em grupos de acordo com seu grau de similaridade (Figura 4.7).

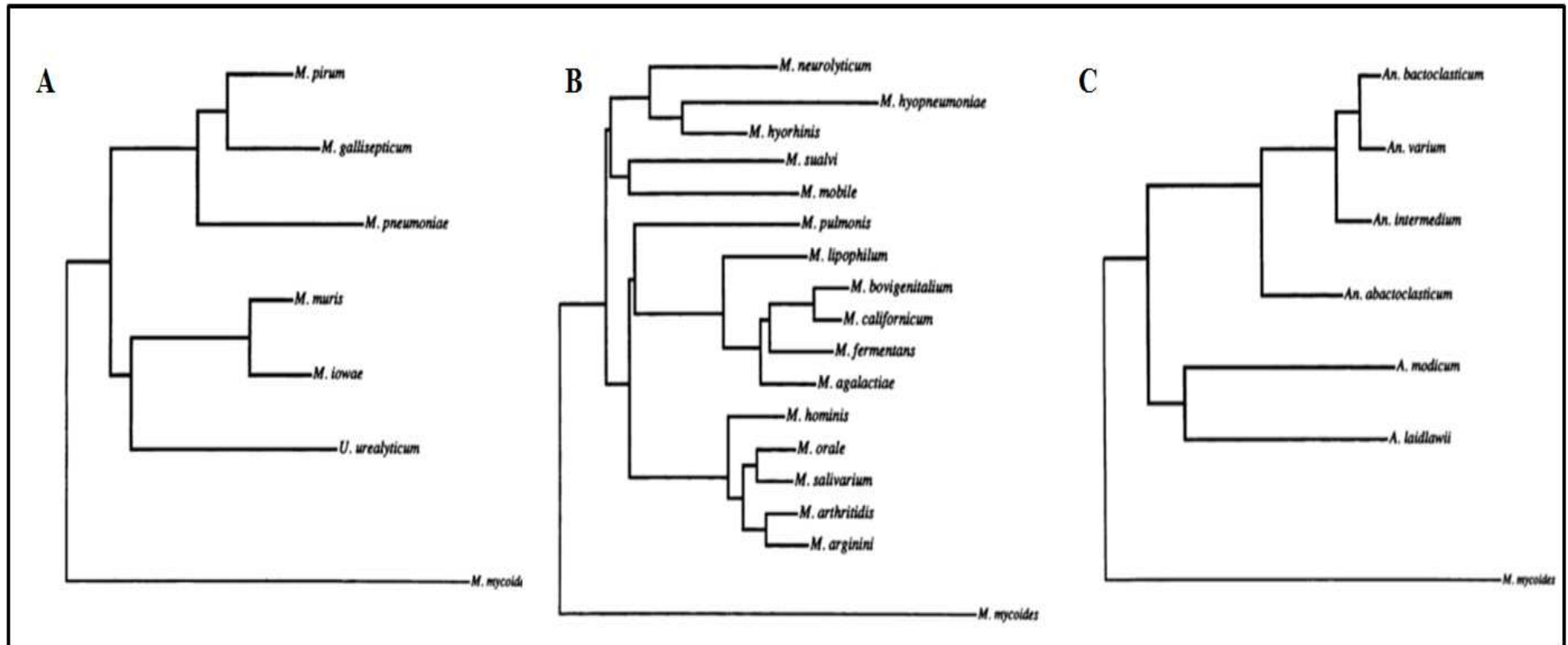


Figura 4.7: Árvores filogenéticas detalhadas dos grupos de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* de acordo com o grau de similaridade. Fonte: [Adaptado] Weisburg et al., 1989. **A, B e C:** Árvores filogenéticas demonstrando a similaridade entre algumas espécies de *Mycoplasma*: *M. pirum*, *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae* (A), *M. hyorhinis*, *M. orale* e *M. arginini* (B), e *A. laidlawii* destacado na figura C, revelando homologia com outras espécies bacterianas distintas do gênero *Mycoplasma*.

Portanto, as sete espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* foram realinhadas, separando-as em três grupos: a) grupo 1: *M. hyorhinae*, *M. fermentans*, *M. arginini*, *M. orale* e *M. synoviae*; b) grupo 2: *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae*; c) grupo 3: *A. laidlawii*.

Inicialmente, para facilitar a visualização de uma região favorável específica de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* que contivesse até 200 pb, apenas a sequência gênica de uma das três espécies de bactérias filogeneticamente próximas aos micoplasmas foi utilizada no alinhamento com cada um dos grupos relatados anteriormente. Apesar de trabalhos anteriores reportarem a maior proximidade filogenética do gênero *Clostridium* à classe *Mollicutes* (Weisburg et al., 1989; Bóve, 1993; Wolf et al., 2004), de acordo com outros autores (Neimark, 1979; van Kuppeveld et al., 1992; Maniloff, 1996) o gênero *Streptococcus* apresenta elevado grau de similaridade com os micoplasmas. Como foi observado através de alinhamentos anteriores que *S. pyogenes* era a espécie que mais compartilhava regiões com os micoplasmas, somente a sequência gênica do locus 16S rDNA desta espécie foi alinhada aos três grupos de micoplasmas para a exclusão das regiões em comum (Figura 4.8). Em seguida, os iniciadores selecionados foram avaliados quanto à sua similaridade em relação à *C. sporogenes* e à *L. acidophilus* e, por fim, quanto ao tamanho, T_m , formação de alças e dímeros.

Da mesma forma que trabalhos anteriores utilizaram iniciadores espécie-específicos (Blanchard et al., 1990, van Kuppeveld et al., 1992; Rawadi et al., 1993; Roulland-Dussoix et al., 1994), foram selecionados um total de onze (cinco senso e seis anti-senso) iniciadores (Tabelas 4.1, 4.2 e 4.3).

Os iniciadores F1 (senso) e R1 (anti-senso) foram prospectados para o grupo 1 para amplificar nas cinco espécies de *Mycoplasma* sp. a região do locus 16S rDNA com 182 pb (Figura 4.8) (Tabela 4.1).

Para o grupo 2 não foi possível prospectar um único par para *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae* com similaridade acima de 90% (Tabela 4.2). Portanto, o grupo 2 foi subdividido em 2M, com iniciadores F2R2 para a detecção de *M. gallisepticum* e 2P, que amplificam *M. pneumoniae* através dos iniciadores MPF3 e MPR3 (Figura 4.8) (Tabela 4.1 e 4.2).

Foram prospectados para o grupo 3 seis conjuntos de iniciadores - F3R3, F3R4, F3R5, F4R3, F4R4 e F4R5- os quais foram testados para a escolha daquele com o melhor desempenho. Apesar dos pares F3R4 e F3R5 formarem produtos de tamanho superior a 200 pb, estes foram testados *in vitro* uma vez que essa diferença ultrapassa o limite em apenas 4 e 10 pb, respectivamente. (Tabela 4.1).

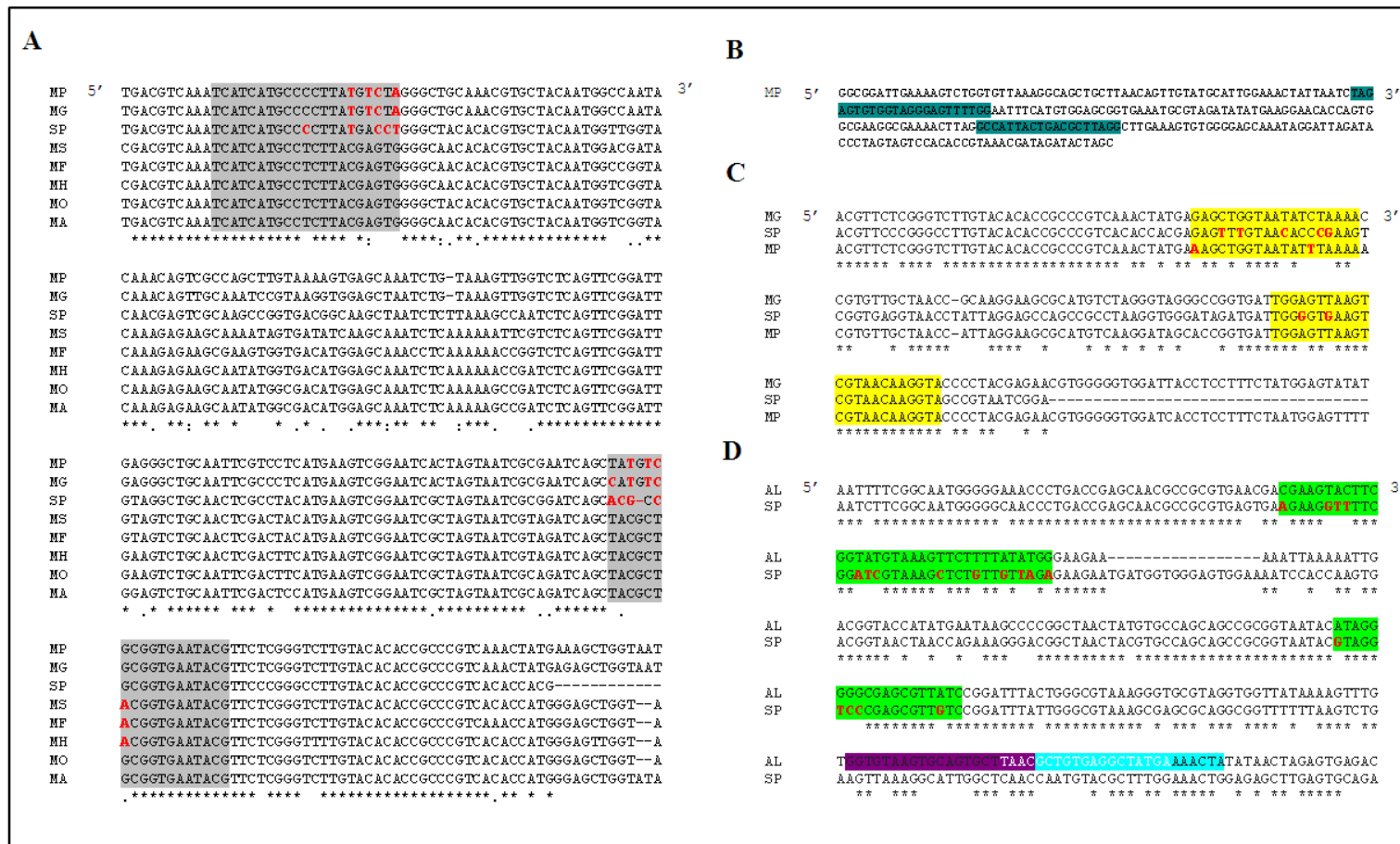


Figura 4.8: Alinhamento das espécies do grupo 1, 2M, 2P e 3. **A:** As regiões em cinza destacadas correspondem aos iniciadores senso e anti-senso escolhidos para amplificar as espécies do grupo 1. As bases em vermelho indicam os locais onde os iniciadores não conseguirão se ligar. **B:** As regiões em verde destacadas correspondem aos iniciadores senso e anti-senso escolhidos para amplificar *M. pneumoniae*. **C:** As regiões em amarelo destacadas correspondem aos iniciadores senso e anti-senso escolhidos para amplificar as espécies do grupo 2 e as bases em vermelho indicam os locais onde os iniciadores não conseguirão se ligar. **D:** Para a espécie *A. laidlawii* foram desenhados dois iniciadores senso, destacados em verde, e três anti-senso: região destacada em rosa, bases grifadas em branco e região destacada em azul. As bases em vermelho indicam os locais onde os iniciadores não conseguirão se ligar. Legenda: SP: *S. pyogenes*, MS: *M. synoviae*, MF: *M. fermentans*, MH: *M. hyorhina*, MO: *M. orale*, MA: *M. arginini*, AL: *Acholeplasma laidlawii*, MP: *M. pneumoniae*, MG: *M. gallisepticum*.

Tabela 4.1: Descrição dos grupos de microrganismos quanto às espécies detectadas, seus iniciadores e o tamanho do fragmento amplificado correspondente.

Grupo	Microrganismos	Iniciadores	Fragmento (pb)
1	<i>M. orale</i> , <i>M. synoviae</i> , <i>M. fermentans</i> , <i>M. arginini</i> e <i>M. hyorhinis</i>	F1) 5' TCATCATGCCTCTTACGAGTG 3' R1) 5' CGTATTCACCGCAGCGTA 3'	182
2M	<i>M. gallisepticum</i>	F2) 5' GAGCTGGTAATATCTAAAACCGTGTTG 3' R2) 5' TACCTTGTTACGACTTAACTCCA 3'	91
2P	<i>M. pneumoniae</i>	MP F3) 5' TAGAGTGTGGTAGGGAGTTTTGG 3' MP R3) 5' CCTAAGCGTCAGTATTGGC 3'	110
		F3) 5' ATAGGGGGCGAGCGTTATC 3' R3) 5' GTTAAGCACTGCACTTACACC 3'	189
		F3) 5' ATAGGGGGCGAGCGTTATC 3' R4) 5' TCATAGCCTCACAGCGTTA 3'	204*
		F3) 5' ATAGGGGGCGAGCGTTATC 3' R5) 5' TAGTTTTTCATAGCCTCACAGC 3'	210*
3	<i>A. laidlawii</i>	F4) 5' CTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATATGG 3' R3) 5' GTTAAGCACTGCACTTACACC 3'	87
		F4) 5' CTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATATGG 3' R4) 5' TCATAGCCTCACAGCGTTA 3'	102
		F4) 5' CTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATATGG 3' R5) 5' TAGTTTTTCATAGCCTCACAGC 3'	108

* apesar de terem mais do que 200 pb, estes conjuntos foram testados devido à proximidade do tamanho dos fragmentos em relação a esse limite;

De acordo com a previsão *in silico*, o tamanho dos produtos amplificados pelos conjuntos prospectados variou de 87 a 210 pb (Integrated DNA Technologies[®]) dependendo do grupo alvo (Tabela 4.1).

A T_m dos iniciadores, que deve ser próxima a 60 °C pois está é a temperatura indicada nas etapas de anelamento e extensão (Raymaekers et al., 2009; Applied Biosystem[®], 2013), variou de 52,3 a 56,7 °C (Integrated DNA Technologies[®]). A diferença de T_m entre os oligos específicos para um mesmo grupo variou de 0,8 a 5,1 °C (Integrated DNA Technologies[®]), e entre grupos distintos para o caso de uma reação em multiplex foi de 4,4 °C, obedecendo ao limite de 5 °C de diferença (Tabela 4.2).

Os iniciadores selecionados para cada um dos grupos demonstraram, após análise *in silico*, uma variação de -1,14 a 1,71 kcal/mol (Integrated DNA Technologies[®]), que corresponde a previsão de formação de alças em 35,1 °C e -29,7 °C (Integrated DNA Technologies[®]) (Tabela 4.2) (Figura 4.9).

A energia (kcal/mol) para a formação de dímeros deve ser a menor possível, indicando a menor possibilidade para a sua ocorrência. Para a formação de homodímeros, ela variou de -7,05 a -3,61 kcal/mol (Tabela 4.2) e para heterodímeros, considerando os iniciadores de um mesmo grupo, ela variou de -6,21 a -3,14 kcal/mol. No caso de uma qPCR multiplex, assumindo a utilização de um par de iniciadores de cada grupo, a energia variou de -7,79 a -3,14 kcal/mol (Integrated DNA Technologies[®]) (Tabela 4.3.1 e 4.3.2).

Tabela 4.2: Caracterização dos iniciadores quanto ao percentual de bases CG e à previsão de T_m , formação de alças e homodímeros (Integrated DNA Technologies[®]).

Grupo	Iniciador	T_m (°C)	% CG	Alças (°C)	Alças (kcal/mol)	Homodímero (kcal/mol)
1	F1	54,3	47,6	31,8	-0,62	-5,38
	R1	55,1	55,6	19,7	0,35	-6,75
2M	F2	55,8	40,7	28,7	-0,29	-6,34
	R2	53,2	39,1	35,1	-1,14	-4,85
2P	MPF3	56	47,8	-29,7	1,71	-0,96
	MPR3	53,2	52,6	17,6	0,42	-3,61
3	F3	56,7	57,9	6,9	1,06	-3,61
	F4	52,3	32,1	29,3	-0,6	-5,49
	R3	54	47,6	28,6	-0,23	-7,05
	R4	53,2	47,4	20,5	0,24	-3,61
	R5	52,4	42,9	20,5	0,24	-3,14

Tabela 4.3: Formação de heterodímeros entre os iniciadores prospectados (Integrated DNA Technologies®). Os valores destacados em azul representam a energia necessária para a formação de dímeros entre os iniciadores utilizados na amplificação de micoplasmas pertencentes ao mesmo grupo.

Heterodímero (kcal/mol)											
	F1	F2	MPF3	F3	F4		F1	F2	MPF3	F3	F4
F1	- #	F1	-4,95	F1	-4,77	F1	-6,21	F1	-5,19		
F2	-4,95	F2	- #	F2	-7,18	F2	-4,74	F2	-8,02		
MPF3	-4,77	MPF3	-7,18	MPF3	- #	MPF3	-1,57	MPF3	-3,89		
F3	-6,21	F3	4,74	F3	-1,57	F3	- #	F3	- #		
F4	-5,19	F4	-8,02	F4	-3,89	F4	- #	F4	- #		
R1	-5,91	R1	-6,69	R1	-4,41	R1	-6,75	R1	-8,02		
R2	-4,52	R2	-3,14	R2	-9,53	R2	-4,95	R2	-5,37		
MPR3	-6,21	MPR3	-4,74	MPR3	-5,63	MPR3	-5,63	MPR3	-3,61		
R3	-5,09	R3	-4,64	R3	-4,89	R3	-3,14	R3	-6,21		
R4	-4,95	R4	-6,69	R4	-5,25	R4	-6,21	R4	-4,39		
R5	-3,43	R5	-7,18	R5	-5,25	R5	-6,21	R5	-4,39		

não foi calculado, pois eles não seriam utilizados juntos numa reação de qPCR multiplex por amplificarem apenas *A. laidlawii*.

.Tabela 4.3: Formação de heterodímeros entre os iniciadores prospectados (Integrated DNA Technologies[®]) (continuação).

Heterodímero (kcal/mol)											
R1		R2		MPR3		R3		R4		R5	
F1	-	F1	-4,52	F1	-6.21	F1	-5,09	F1	-4,95	F1	-3,43
F2	-6,69	F2	-	F2	-4.74	F2	-4,74	F2	-6,69	F2	-7,18
MPF3	-	MPF3	-	MPF3	-	MPF3	-	MPF3	-	MPF3	-
F3	-6,75	F3	-4,95	F3	-5.63	F3	-	F3	-6,21	F3	-6,21
F4	-8,02	F4	-5,37	F4	-3.61	F4	-	F4	-	F4	-4,39
R1	- [#]	R1	-5,91	R1	-6.75	R1	-6,69	R1	-6,75	R1	-3,14
R2	-5,91	R2	- [#]	R2	-5.02	R2	-7,79	R2	-4,95	R2	-4,88
MPR3	-	MPR3	-	MPR3	- [#]	MPR3	-	MPR3	-	MPR3	-
R3	-6,69	R3	-7,79	R3	-4.89	R3	- [#]	R3	- [#]	R3	- [#]
R4	-6,75	R4	-4,95	R4	-6.21	R4	- [#]	R4	- [#]	R4	- [#]
R5	-3,14	R5	-4,88	R5	-6.21	R5	- [#]	R5	- [#]	R5	- [#]

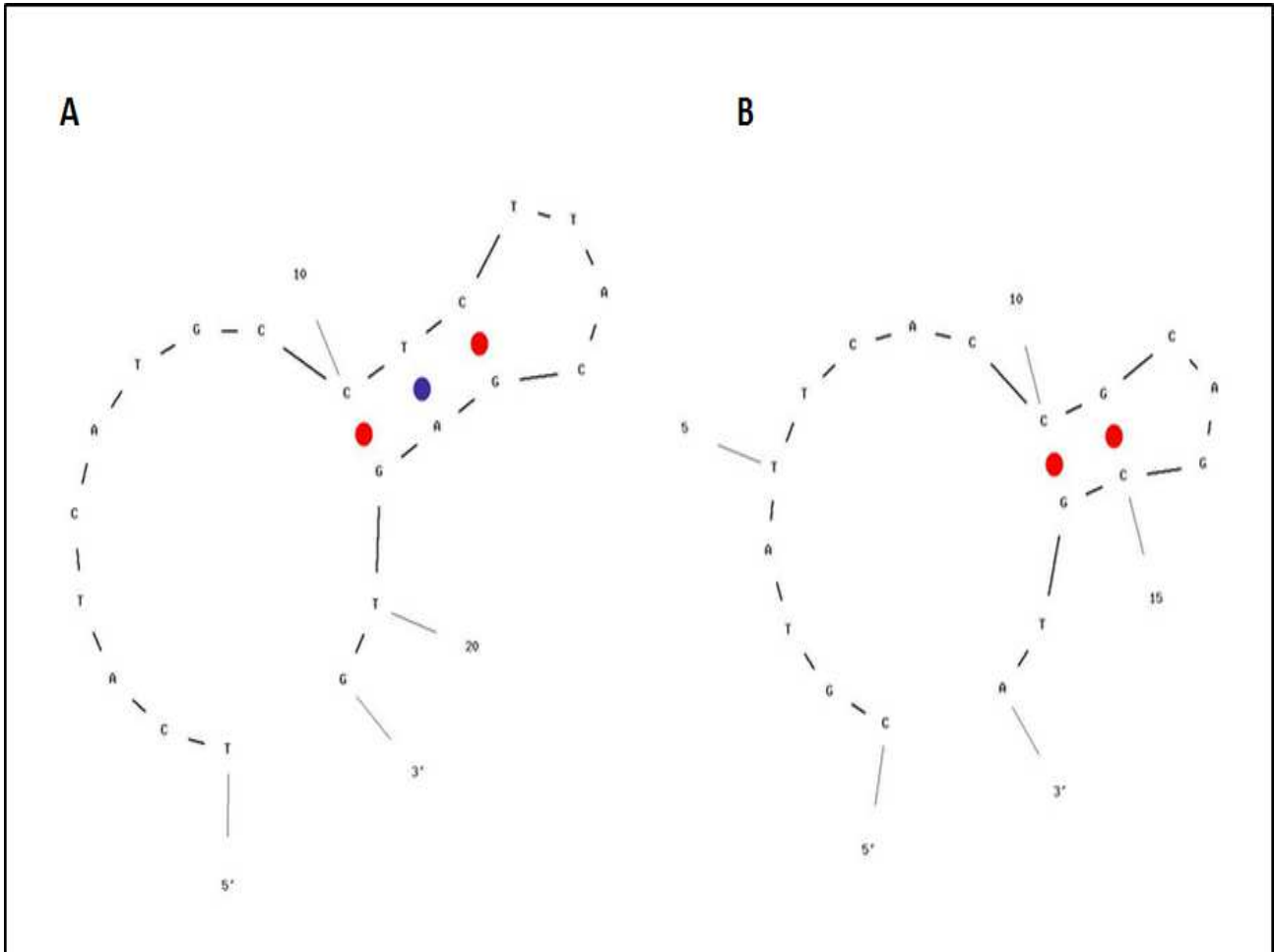


Figura 4.9: Análise *in silico* dos iniciadores F1 (senso) e R1 (anti-senso). A e B: Estrutura das alças formadas por de F1 e R1, respectivamente, com as ligações entre as bases citosina e guanina em vermelho, e as bases timina e adenina em azul. Fonte: IDT OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies[®]).

4.2- Inclusão de espécies de *Mycoplasma* sp. detectadas pelos iniciadores

Apesar das espécies recomendadas pela FE serem os contaminantes mais frequentemente encontrados (Bölske, G. 1988; McGarrity, 1992; Arai, 1994; Drexler & Upfoff, 2002), diversas outras bactérias da classe *Mollicutes* também são detectadas contaminando não só o ambiente laboratorial, como também infectando animais utilizados na produção de insumos para laboratório (Hu et al., 1995; WHO, 1998; Tang et al., 2000; Plotkin et al., 2012; Netto, 2013).

O sistema de detecção SYBR[®] Green foi escolhido para as reações de qPCR *in house* pois permite detecção de um número elevado de espécies de maneira mais simplificada do que quando utilizadas sondas de hidrólise devido à característica inespecífica do fluoróforo de intercalar em qualquer dupla fita de DNA (Raemakers et al., 2009).

Os imunobiológicos como a vacina de febre amarela, devido à sua produção em ovos de galinha embrionados, podem estar sujeitos à contaminação por outras espécies de micoplasmas como *M. gallinaceum* e *M. gallinarum* (Wang, 1990), além de *M. gallisepticum* e *M. synoviae*, que são de detecção obrigatória pela FE 7.0.

Insumos como os soros fetais bovino, suíno e equino são atualmente utilizados em outros ensaios de CQ no DEQUA e, devido à sua origem animal, podem estar contaminados com espécies de micoplasmas específicas: *M. bovis* (Pfützner & Sachse, 1996), *M. alvi* e *M. hypopneumoniae* (Gourlay et al., 1994) e *M. pulmonis* (Allan & Lemcke, 1975), respectivamente. Assim, a utilização de oligonucleotídeos com a capacidade de detectar o maior número possível de espécies de *Mycoplasma* permite a sua aplicação em diversos tipos de amostras, como no caso da demanda do CQ de Bio-Manguinhos.

Através da análise *in silico* no BLASTn[®] (NCBI[®]) dos iniciadores prospectados e descritos anteriormente em 4.1, foi possível determinar o percentual de similaridade entre eles e outras espécies de *Mycoplasma* relacionadas com os imunobiológicos e insumos de Bio-Manguinhos, ou previamente relatadas na literatura como importantes contaminantes do ambiente laboratorial (Rawadi et al., 1995; Razin et al., 1998; Drexler & Upfoff, 2002). Além disso, foi também pesquisado sem a seleção de uma espécie específica, quais as espécies de *Mycoplasma* teriam 100% de similaridade com os iniciadores prospectados. Nos casos em que o grau de semelhança encontrado foi acima de 70% (Razin et al., 1998), as espécies foram consideradas como detectáveis pelos oligonucleotídeos.

Os iniciadores dos grupos 1 e 2M apresentam não somente similaridade acima de 94% com os micoplasmas preconizados pela FE, mas também possuem esse percentual com pelo menos outras 40 espécies do mesmo gênero- 35 com os do grupo 1 e 5 com os do grupo 2M (Tabela 4.4). Além disso, como o iniciador F2 possui 89% de similaridade com *M. pneumoniae*, e o anti-senso R2 100%, é provável que este conjunto também consiga detectar esta espécie, além do par MPF3/R3 desenhado especificamente para este micoplasma.

Como ao menos 41 bactérias da classe *Mollicutes* poderiam ser detectadas pelos iniciadores dos quatro grupos do protocolo desenvolvido *in house* (Tabela 4.4), seria possível aumentar a quantidade de produtos para testes de CQ realizados na SETBI que necessitam de certificado de esterilidade, assim como ampliar a segurança dos imunobiológicos produzidos.

Tabela 4.4: Espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* detectadas *in silico* por cada um dos conjuntos de iniciadores desenhados. O uso dos oligonucleotídeos prospectados permite a detecção de pelo menos 41 espécies de micoplasma, pois cada um dos iniciadores senso e anti-senso possuem 94-100% de identidade com as espécies descritas abaixo. As espécies em negrito são aquelas preconizadas pela FE para a pesquisa de micoplasmas em imunobiológicos.

Espécies de <i>Mycoplasma</i> sp. e <i>A. laidlawii</i>					
	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. columborale</i>	<i>M. iners</i>	<i>M. phocirhinis</i>
	<i>M. anatis</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. lipofaciens</i>	<i>M. primatum</i>
	<i>M. arginini</i>	<i>M. caviae</i>	<i>M. gallinarum</i>	<i>M. maculosum</i>	<i>M. pulmonis</i>
Grupo 1-F1R1	<i>M. bovigentialium</i>	<i>M. citelli</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. meleagridis</i>	<i>M. spermatophilum</i>
	<i>M. bovis</i>	<i>M. conjunctivae</i>	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. opalescens</i>	<i>M. synoviae</i>
	<i>M. californicum</i>	<i>M. columbinasale</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. testudineum</i>
	<i>M. canadense</i>	<i>M. columbinum</i>	<i>M. iguanae</i>	<i>M. phocicerebrale</i>	<i>M. zalophidermidis</i>
Grupo 2M- F2R2	<i>M. alvi</i>	<i>M. gallisepticum</i>	<i>M. imitans</i>	<i>M. pirum</i>	<i>M. pneumoniae</i> *
Grupo 2P- MPF3/R3	<i>M. pneumoniae</i>	-	-	-	-
Grupo 3- F3R3/ F3R4/ F3R5/ F4R5	<i>A. laidlawii</i>	-	-	-	-

* 89% de similaridade com F2.

4.3- Otimização das reações de qPCR *in house*

A otimização da concentração dos iniciadores nas reações de qPCR é uma etapa essencial pois tanto em quantidades insuficientes, quanto em excesso formando dímeros, podem diminuir a sensibilidade de detecção do alvo e a eficiência da reação (Bustin et al., 2009). Além disso, os iniciadores dimerizados podem diminuir a especificidade do ensaio, principalmente quando utilizado o sistema SYBR[®] Green, devido à formação de sítios para a ligação da enzima *Taq polimerase*, que promoverá a extensão de produtos inespecíficos que podem ser confundidos com um resultado positivo. (Raymaekers et al., 2009; Rinttilä et al., 2004; Spandidos et al., 2009).

4.3.1- Otimização do par F3R3

A concentração apropriada de iniciadores para reações de qPCR variam dependendo de suas características como tamanho, conteúdo CG e propensão à formação de dímeros. Além disso, o tamanho e composição do produto de qPCR formado também influencia no processo de otimização da reação (Raymaekers et al., 2009; Life Technologies, 2015b).

De acordo com Ponchel et al. (2003), a concentração ideal de iniciadores é considerada ótima quando a formação de produto específico em relação a formação de dímeros é máxima em um experimento positivo *versus* negativo. Apesar de serem relatadas fórmulas para o seu cálculo (Life Technologies, 2015b, 2015c), não há um consenso sobre a sua utilização.

Apesar das diferentes indicações na literatura acerca das faixas ótimas de concentração dos iniciadores (Life Technologies[®], 2015b; 5PRIME[®], 2015; Sigma Aldrich, 2015), há um consenso que maiores concentrações de oligonucleotídeos propiciam a formação de dímeros, sendo mais indicado o uso de iniciadores com as menores concentrações possíveis (Sigma Aldrich, 2015).

De forma a avaliar o perfil de amplificação do par F3R3 (escolhido para amplificar *A. laidlawii* conforme descrito posteriormente em 4.4.1.4 e 4.4.1.5) e a presença de dímeros de iniciadores, as concentrações de 800 nM, 600 nM, 400 nM e 200 nM foram testadas para a detecção de 25, 5 e 0,5 UFC de *A. laidlawii*.

Além de ter sido detectado 0,5 UFC de *A. laidlawii* em todas as concentrações anteriores em pelo menos uma das replicatas, foi observado a ausência de dimerização de iniciadores mesmo com 800 nM (Figura 4.10) (Tabela 4.5). A utilização de ensaios com a combinação de diferentes concentrações de iniciador senso e anti-senso também revelaram resultados similares (dados não

mostrados), demonstrando a possibilidade da utilização de maiores concentrações desses oligonucleotídeos nas reações de qPCR.

Tabela 4.5: Valores de C_q e T_m das reações de otimização dos iniciadores senso e anti-senso F3 e R3 com 200 nM, 400 nM, 600 nM e 800 nM.

<i>A.laidlawii</i> (UFC)	Iniciador senso F3 (nM)	Iniciador anti-senso R3 (nM)	C_q	T_m	
25	200	200	29,21	74,12	
			28,94	74,46	
	400	400	28,25	74,83	
			28,58	74,83	
	600	600	28,11	74,98	
			28,06	75,15	
	800	800	28,49	74,83	
			28,02	75,01	
	5	200	200	32,06	74,64
				32,04	74,98
400		400	31,84	74,83	
			32,79	74,83	
600		600	31,76	75,49	
			32,43	75,67	
800		800	30,74	75,01	
			31,94	74,83	
0,5		200	200	-	66,32
				35,01	74,98
	400	400	-	69,18	
			36,04	74,49	
	600	600	34,63	75,49	
			34,45	75,49	
	800	800	34,99	74,83	
			-	66,77	

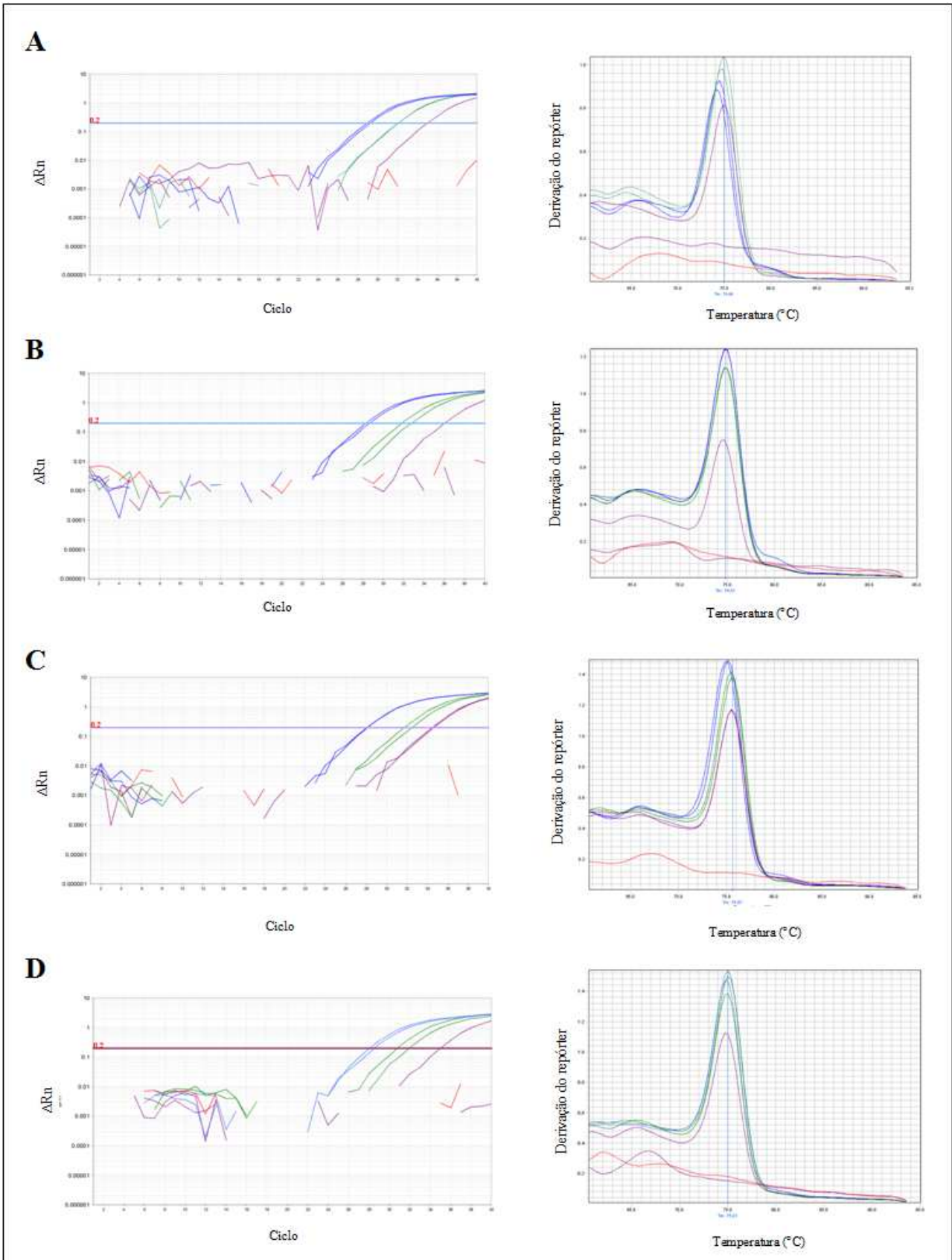


Figura 4.10: Otimização das reações de qPCR *in house* com os iniciadores F3R3. (Da esquerda para direita) A-D: Curvas de amplificação e de dissociação de 25 (em azul), 5 (em verde) e 0,5 UFC (em roxo) de *A. laidlawii* com os iniciadores F3R3 nas concentrações de 200 nM, 400 nM, 600 nM e 800 nM, respectivamente.

Como o aumento da concentração de iniciadores também aumenta a chance de detecção do DNA alvo, foi testado em um novo ensaio as concentrações de 800 nM e 1 μ M do conjunto F3R3 (Figura 4.11).

A amplificação de *A. laidlawii* não ocorreu de forma satisfatória, uma vez que os valores de C_q de 25 UFC neste ensaio, quando utilizada a concentração de 800 nM, foram superiores em aproximadamente 5 aos obtidos no ensaio anterior (Tabela 4.6). Uma vez que as condições experimentais se mantiveram as mesmas, esse resultado pode ser indicativo de degradação do DNA alvo. Entretanto, foi possível avaliar a formação de dímeros quando utilizados na concentração de 1 μ M.

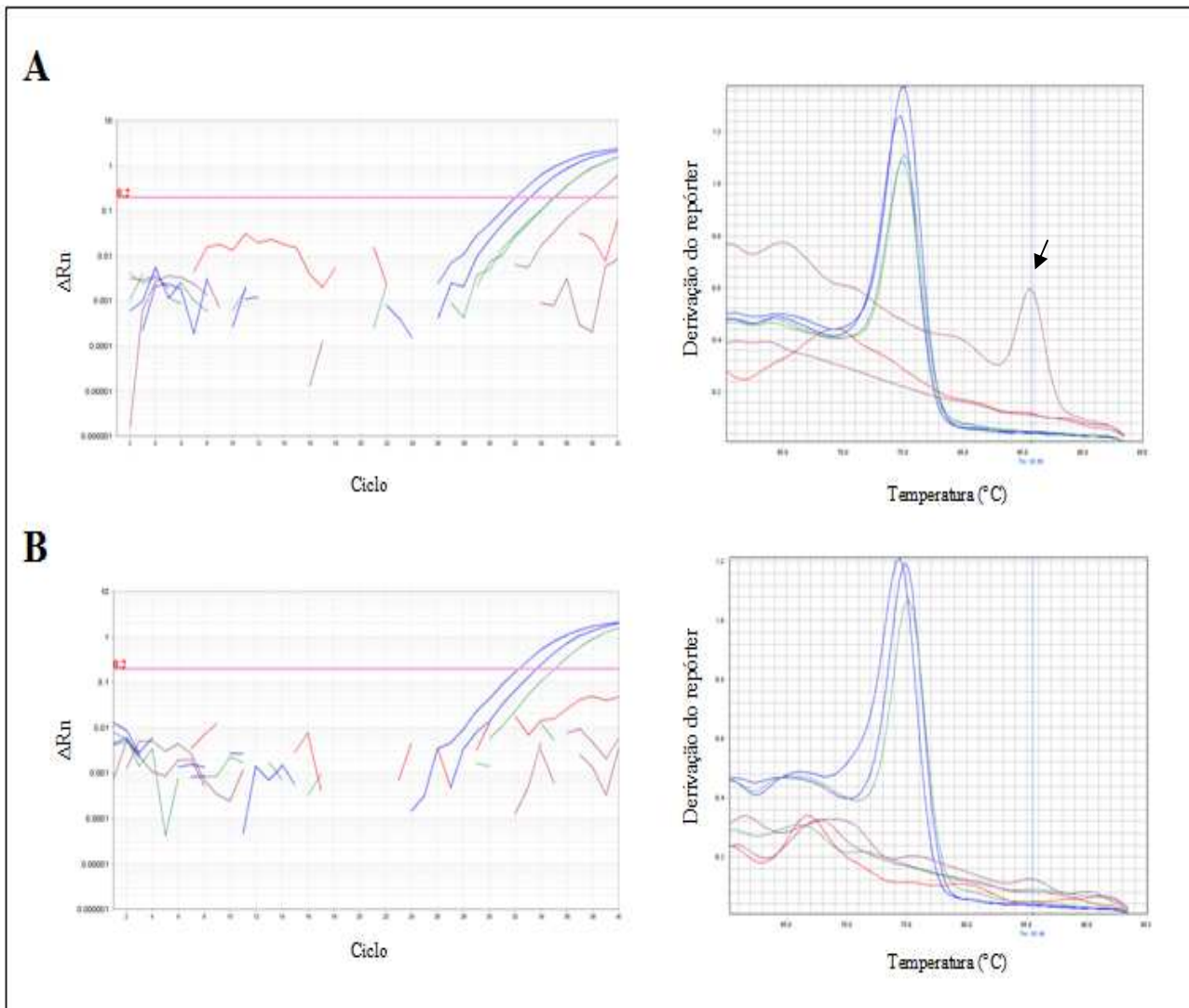


Figura 4.11: Ensaio de amplificação de *A. laidlawii* com o par F3R3 nas concentrações de com 1 μ M e 800 nM. A e B: Amplificação de 25 (em azul), 5 (em verde) e 0,5 UFC (em laranja) de *A. laidlawii* com 1 μ M e 800 nM de F3R3, respectivamente. Controle negativo de amplificação em vermelho e controle negativo de extração na ponta da seta.

Tabela 4.6: Valores de C_q e T_m das reações de otimização dos iniciadores senso e anti-senso F3 e R3 com 800 nM e 1 μ M.

<i>A.laidlawii</i> (UFC)	Iniciador senso F3	Iniciador anti-senso R3	C_q	T_m
25			33,11	74,62
			32,01	74,97
5	1 μ M	1 μ M	35,01	74,97
			35,01	75,14
0,5			38,02	85,66
			-	63,58
25			32,26	74,28
			33,64	74,97
5	800 nM	800 nM	-	85,49
			35,01	75,14
0,5			-	67,72
			-	68,75

De acordo com os resultados descritos anteriormente na prospecção dos iniciadores, o conjunto F3R3 possui baixa complementariedade entre si (Tabela 4.3) e, portanto, pequena propensão à formação de dímeros. Corroborando com as análises *in silico*, a formação de dímeros de iniciadores não prejudicou a interpretação dos resultados, mesmo na concentração de 1 μ M, através da análise de C_q (inexistente) e curva de dissociação com T_m de 69,27 °C (Figura 4.11), sendo portanto esta a concentração adotada para a reação de qPCR *in house* referente ao par F3R3.

4.3.2- Otimização do par F1R1

Da mesma forma que nos ensaios para a otimização dos iniciadores F3R3, foram testadas as concentrações de 200 a 800 nM para a detecção de 25, 5 e 0,5 UFC de *M. orale*. Assim como com F3R3, foi possível a detecção da menor quantidade de bactéria alvo em todas as concentrações de oligonucleotídeos. Ainda, mesmo na concentração de 800 nM, não houve formação de dímeros (dados não mostrados).

Seguindo a mesma lógica previamente adotada, foram testadas as concentrações de 1 μ M e 800 nM dos iniciadores F1 e R1.

Como foi possível detectar até 0,5 UFC de *M. orale* nas duas concentrações, e não houve curva de amplificação no controle negativo de qPCR (Tabela 4.7) (Figura 4.12), foi escolhida a concentração de 1 μ M para as reações de qPCR *in house* com o conjunto F1R1.

Tabela 4.7: Valores de C_q e T_m das reações de otimização dos iniciadores senso e anti-senso F1 e R1 com 800 nM e 1 μ M.

<i>M. orale</i> (UFC)	Iniciador senso F1	Iniciador anti-senso R1	C_q	T_m		
25	1 μ M	1 μ M	24,47	76,62		
			24,78	77,14		
28,28			76,96			
28,31			77,31			
32,68			77,48			
31,89			77,31			
25			800 nM	800 nM	24,70	77,14
24,84					77,31	
28,36					77,31	
28,06					77,48	
33,75	77,31					
30,87	77,65					
5	0,5					
0,5						
0,5						

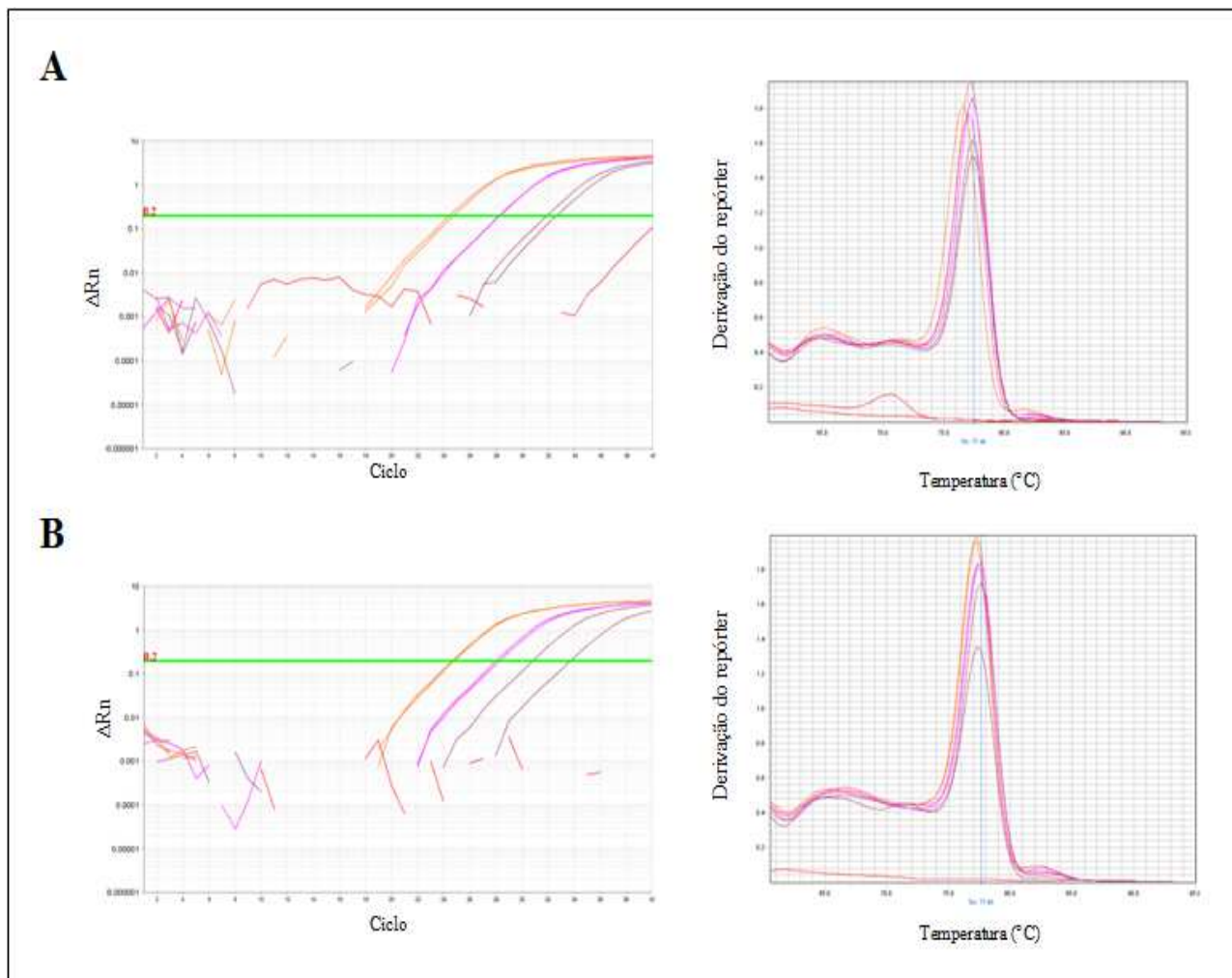


Figura 4.12: Ensaio de otimização dos iniciadores F1R1. A e B: Amplificação de 25 (em laranja), 5 (em rosa) e 0,5 UFC (em roxo) de *M. orale* com 1 μ M e 800 nM de F1R1, respectivamente. Controle negativo de amplificação em vermelho.

4.3.3- Otimização do par F2R2 e MPF3/R3

De forma a reduzir gastos e tempo, e devido aos resultados obtidos nos ensaios de otimização anteriores com os conjuntos F1R1 e F3R3 corroborarem com a análise *in silico* realizada na prospecção dos iniciadores, os conjuntos F2R2 e MPF3/R3 foram testados na concentração de 1 μ M para a detecção de 25 UFC de *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae*.

Nas reações com os conjuntos F2R2 e MPF3/R3, apesar dos controles negativos de amplificação apresentarem curva de amplificação e de dissociação, os valores de C_q e T_m obtidos foram de 39,22 e 67,48 $^{\circ}$ C, e 35,47 e 72,14 $^{\circ}$ C, respectivamente. Portanto, a formação de dímeros não prejudicou a amplificação de 25 UFC de *M. gallisepticum*, a qual ocorreu em C_q 28,41 (média; $dp= 0,16$) e T_m 74,96 $^{\circ}$ C (média; $dp= 0,36$) (Figura 4.12 A) e de 25 UFC de *M. pneumoniae* em C_q 23,42 (média; $dp= 0,12$) e T_m 75,44 $^{\circ}$ C (média; $dp= 0$) (Figura 4.12 B).

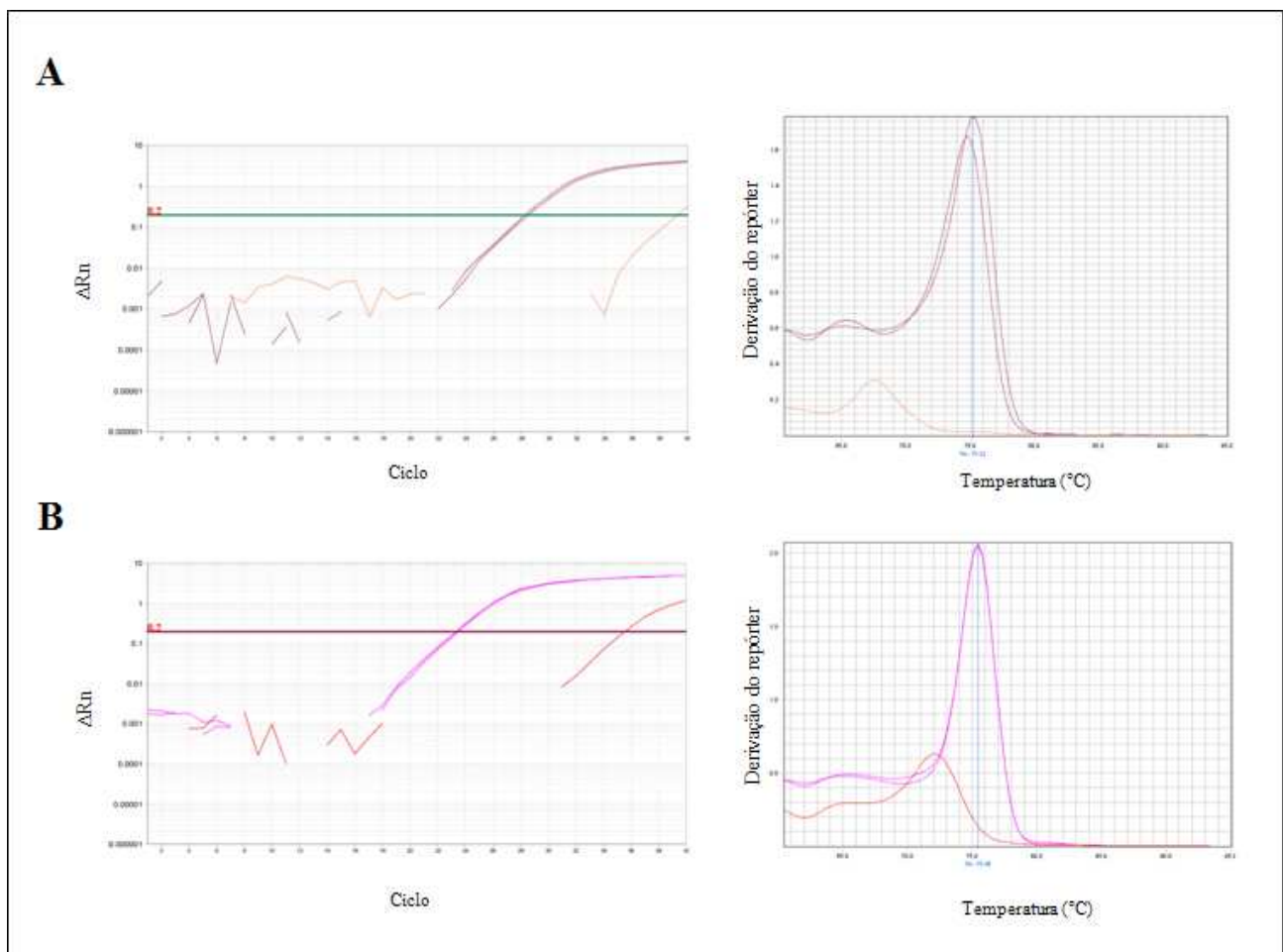


Figura 4.13: Ensaio de otimização com F2R2 e MPF3/R3. A: Amplificação de 25 UFC de *M. gallisepticum* (em roxo) com 1 μ M de F2R2 por qPCR *in house*. **B:** Amplificação de 25 UFC de *M. pneumoniae* (em rosa) com 1 μ M de MPF3/ R3 por qPCR *in house*. Controle negativo de amplificação em vermelho.

Como os iniciadores F2 e R2 possuem similaridade com *M. pneumoniae* de 89 e 100%, respectivamente, foi realizado um ensaio comparando as reações de amplificação de 25 UFC desta espécie, com este par e o conjunto MPF3/R3 (par específico) (Figura 4.14).

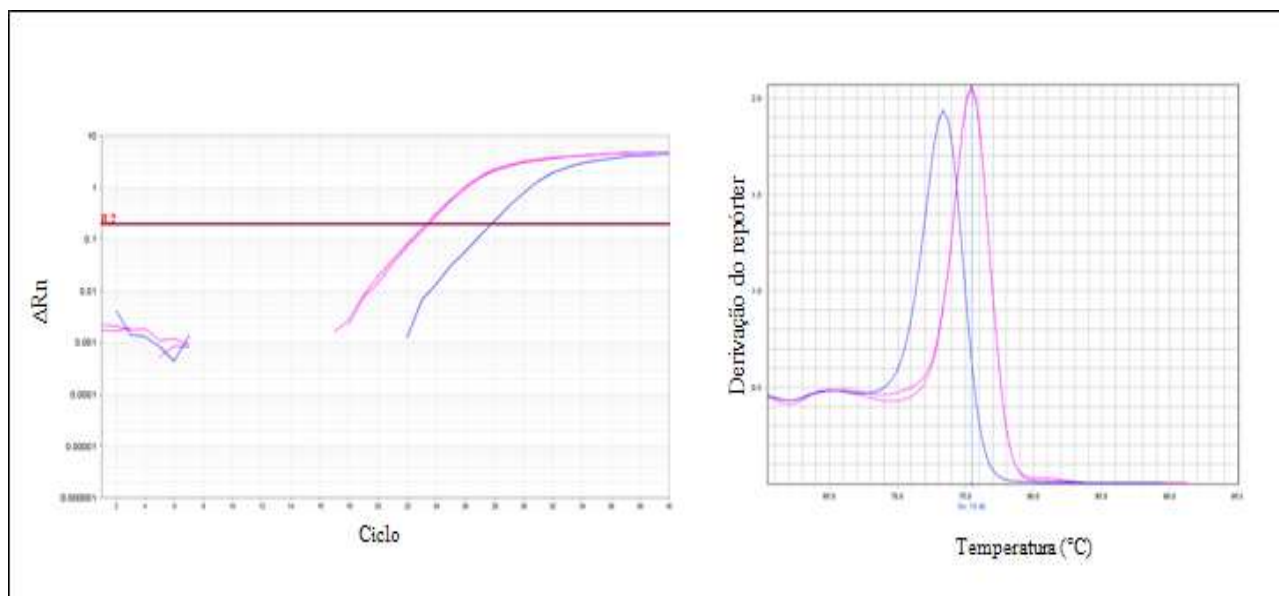


Figura 4.14: Comparação dos iniciadores F2R2 e MPF3/R3 na detecção de *M. pneumoniae*. Amplificação de 25 UFC de *M. pneumoniae* pelos conjuntos F2R2 (em azul) e MPF3/R3 (em rosa).

Tabela 4.8: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de 25 UFC de *M. pneumoniae* utilizando os iniciadores F2R2 e MPF3/R3.

<i>M. pneumoniae</i> (UFC)	Iniciador senso 1 μ M	Iniciador anti-senso 1 μ M	C_q	T_m
25	F2	R2	27,98	73,66
			29,58	73,49
25	MPF3	MPR3	28,20	75,80
			27,95	76,67

Conforme esperado pela análise *in silico*, o par F2R2, além de amplificar *M. gallisepticum* também é capaz de detectar *M. pneumoniae*, porém com menor sensibilidade (Tabela 4.8) e com diferença na T_m - 73,36 °C (F2R2) e 75,44 °C (MPF3/R3). Essa diferença na temperatura de dissociação pode ser justificada pelas diferentes regiões do *locus* 16S rDNA amplificadas por cada um dos conjuntos de iniciadores (Figura 4.8), que por terem tamanhos, composição de CG e seqüências de bases nitrogenadas distintas, afetam diretamente esse parâmetro (Santa Lucia, 1998; Raymaekers et al., 2009; Spandidos et al., 2009; Life Technologies®, 2012). De forma a corroborar com este racional, foi utilizado o programa IDT OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies®) para estimar a T_m dos dois fragmentos. Apesar das temperaturas encontradas não refletirem os

resultados obtidos *in vitro*- provavelmente pela análise *in silico* utilizar parâmetros de concentração de magnésio e sal distintos dos ensaios por qPCR *in house*- foi observada também uma diferença de T_m entre os dois fragmentos: 1,4 °C (Integrated DNA Technologies[®]).

Nos ensaios de qPCR *in house*, o conjunto MPF3/R3 demonstrou um melhor desempenho em comparação ao par F2R2 na detecção de *M. pneumoniae* com relação à sua maior sensibilidade (Figura 4.13 e 4.14). Além disso, a T_m do fragmento formado foi superior (Figura 4.13 e 4.14), evitando assim que a amplificação desta espécie pudesse ser confundida com dímeros de iniciadores, principalmente se em baixa contaminação ou considerando um ensaio multiplex. Portanto, os iniciadores MPF3/R3 foram escolhidos para os ensaios subsequentes para a detecção de *M. pneumoniae* pela qPCR *in house*.

Dessa forma, a concentração adotada para qPCR *in house* com os iniciadores F2, R2, MPF3 e MPR3, assim como os outros conjuntos prospectados, foi de 1 µM.

4.4- Especificidade

4.4.1- Ensaios com as bactérias do gênero *Streptococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus* sp.

A classe *Mollicutes* pode ser dividida em seis gêneros, dentre eles o *Mycoplasma* sp.- o que contém o maior número de espécies- e o *Acholeplasma* sp. (Razin et al., 1998). A caracterização molecular da região 16S rDNA revelou que essa classe é relacionada filogeneticamente às bactérias gram-positivas com DNA de baixa composição citosina/guanina (Woese et al., 1987; Weisburg et al., 1989; Razin et al., 1998). Por isso, a comprovação da especificidade dos iniciadores deve não só ser baseada em análises *in silico* através da ferramenta BLASTn[®] (NCBI[®]), mas também ser evidenciada a partir de ensaios experimentais *in vitro*, como avaliação de perfil de amplificação e curva de dissociação nos ensaios de qPCR (Bustin et al., 2009).

Apesar de alguns estudos utilizarem diversas bactérias gram-positivas para testes de especificidade (van Kuppeveld et al., 1992; Teyssou et al., 1993; Wirth, 1994; Tabatabaei-Qomi et al., 2014), foram obedecidos os critérios estabelecidos no capítulo 2.6.7 da FE 7.0, que preconiza o uso de espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Clostridium* e *Lactobacillus* sp. para os testes de especificidade quando se utiliza técnicas NAT para detecção de micoplasmas (Deutschmann et al., 2010), por serem bactérias filogeneticamente próximas aos microrganismos da classe *Mollicutes*.

Uma vez que são aplicadas as boas práticas de fabricação e de laboratório, não é esperada a ocorrência de uma contaminação bacteriana maciça no processo produtivo de produtos farmacêuticos e no ambiente laboratorial (Deutschmann et al., 2010). Dessa forma, foi testado o DNA na concentração correspondente a 100 UFC/mL de cada uma das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus*, que para um ensaio sensível como a qPCR, representa uma quantidade elevada de massa bacteriana.

A especificidade dos iniciadores para cada grupo de micoplasmas foi avaliada frente à ausência de amplificação ou formação de produto inespecífico, por análise de C_q associada à T_m .

4.4.1.1- Ensaio com os iniciadores do grupo 1 (*M. orale*, *M. synoviae*, *M. fermentans*, *M. arginini* e *M. hyorhinis*)

De acordo com a análise *in silico* (BLASTn[®] - NCBI[®]), o percentual de similaridade entre o iniciador senso F1 e a região 16S rDNA de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus* foi de 66,7%, e entre o anti-senso R1 e o mesmo *locus* foi de 88,8% para as espécies *S. pyogenes* e *L. acidophilus*, e de 66,7% para *C. sporogenes* (Tabela 4.9). Apesar da similaridade do R1 estar acima de 70% nos casos de *Streptococcus* e *Lactobacillus*, ensaios de qPCR *in house* foram realizados para descartar a possibilidade de haver amplificação, uma vez que a formação de produto de forma efetiva necessita da participação tanto do iniciador senso quanto do anti-senso.

O conjunto FIR1, desenhado para a detecção de cinco espécies de micoplasmas recomendados pela FE 7.0, amplificou 100 UFC de *M. orale* e *M. synoviae*, em C_q de 25,57 (média; dp= 0,11) e 26,02 (média; dp= 0,13) e curva de dissociação com pico único em temperatura de 78,26 (média; dp= 0,12) e 76,48 °C (média; dp= 0,24) (Figura 4.15 A), respectivamente. Essa diferença na T_m entre as duas espécies pode ser justificada pela diferença de conteúdo CG do fragmento amplificado (43,4% - *M. synoviae* e 47,8% - *M. orale*), que afeta diretamente a temperatura de dissociação.

Nos ensaios com 100 UFC de cada uma das três espécies de bactérias filogeneticamente próximas aos micoplasmas individualmente (Figura 4.15 B) e em *pool* (Figura 4.15 C), não houve amplificação nos testes, ou os C_q de amplificação encontrados foram acima de 35 (exceto *C. sporogenes*), com formação de picos inespecíficos nas curvas de dissociação (Tabela 4.9). A presença de picos na curva de dissociação de *Streptococcus* e *Lactobacillus* pode ter ocorrido devido ao elevado percentual de similaridade do iniciador anti-senso R1 com estas bactérias. Entretanto, como a T_m é bem diferente da T_m das bactérias da classe *Mollicutes*, assim como o perfil

da curva de dissociação, isso não inviabilizou a utilização do conjunto F1R1 nos ensaios subsequentes de qPCR *in house*.

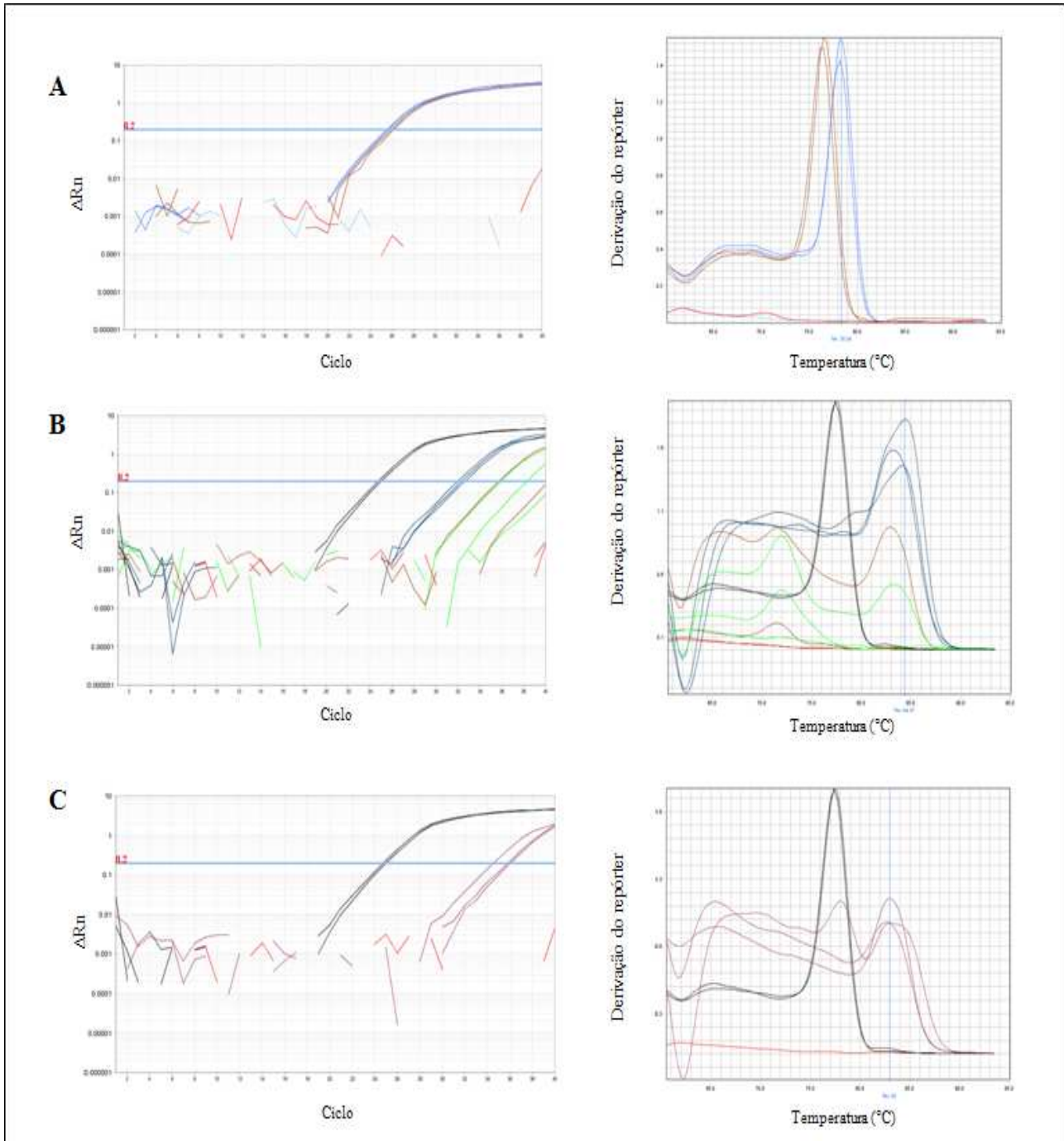


Figura 4.15: Teste de especificidade do conjunto F1R1. (Da esquerda para direita) **A:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *M. orale* (em azul) e *M. synoviae* (em marrom) e suas respectivas curvas dedissociação. **B:** Gráfico de amplificação de 25 UFC de *M. orale* (em preto) e de 100 UFC de *S. pyogenes* (em marrom), *L. acidophilus* (em azul) e *C. sporogenes* (em verde) e suas respectivas curvas de dissociação. **C:** Gráfico de amplificação de 25 UFC de *M. orale* (em preto) e *pool* com 100 UFC de *S. pyogenes*, *L. acidophilus* e *C. sporogenes* (em vinho) e suas respectivas curvas de dissociação.

Tabela 4.9: Teste de especificidade de F1R1. Valores de C_q e T_m encontrados nas triplicatas dos ensaios de qPCR das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus* e de *pool* com essas três espécies e análise *in silico* no GenBank® (NCBI®) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade com F1	Região codificante	Similaridade com R1	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	35,95	71,54	66,7 % (KJ620886)	16S rDNA	88,9% (JN578220)	16S rDNA
	38,25	62,14				
	-	82,83				
<i>C. sporogenes</i>	32,66	83,17	71,4% (CP011663)	Proteína de transporte	66,7 % (CP011663)	16S rDNA
	32,4	84,37				
	32,03	84,2				
<i>L. acidophilus</i>	-	71,88	66,7% (KP966439)	16S rDNA	88,9% (KJ850588)	16S rDNA
	-	72,06				
	35,77	62,99				
<i>Pool</i>	35,47	82,83	-	-	-	-
	35,47	65,39				
	35,7	83				

4.4.1.2- Ensaios com os iniciadores do grupo 2M (*M. gallisepticum*)

Nos ensaios de especificidade com o conjunto F2R2, a amplificação de 100 UFC de *M. gallisepticum* ocorreu em C_q 30,15 (média; dp= 0,14) e T_m de 76,06 °C (média; dp= 0). Adicionalmente, foi testado DNA de 100 UFC de *M. pneumoniae*, que amplificou em C_q e T_m 28,78 (média; dp= 1,13) e 73,57 °C (média; dp= 0,12) (Figura 4.16 A), mantendo o mesmo resultado em relação à T_m encontrado em 4.3.3.

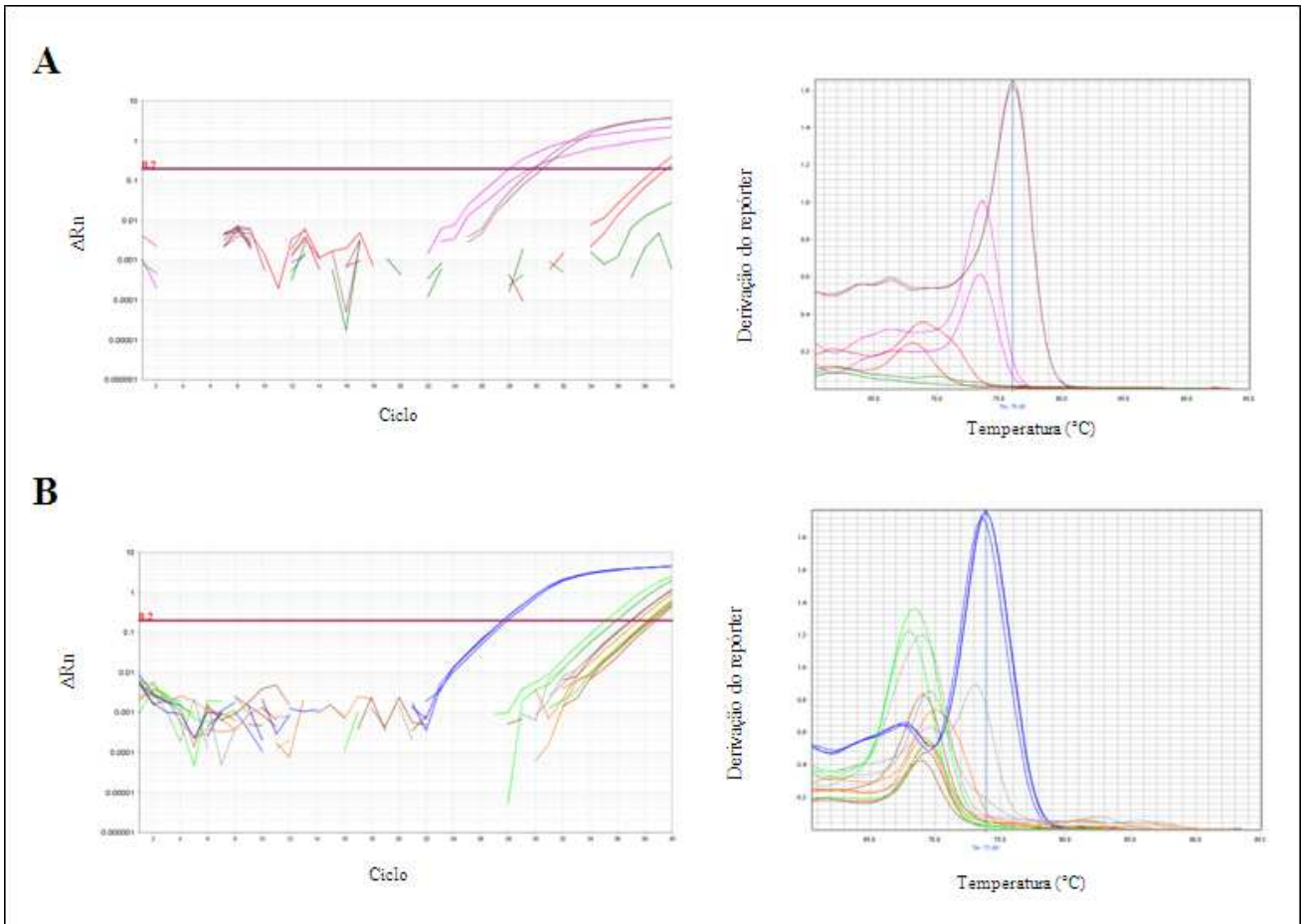


Figura 4.16: Teste de especificidade do conjunto F2R2. (Da esquerda para direita) **A:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *M. gallisepticum* (em vinho), 100 UFC de *M. pneumoniae* (em rosa), controle de extração (em verde) e controle negativo de qPCR (em vermelho), e suas respectivas as curvas de dissociação. **B:** Gráfico de amplificação de 25 UFC de *M. pneumoniae* (em azul) e 100 UFC de *S. pyogenes* (em verde), *L. acidophilus* (em marrom), *C. sporogenes* (em laranja) e *pool* das três espécies (em laranja) e suas respectivas curvas de dissociação.

Apesar do conteúdo CG de *M. gallisepticum* ser similar em relação ao de *M. orale*, *M. synoviae* (48,4%, 49,4% e 45,9%, respectivamente- Integrated DNA Technologies[®]), sugere-se que a T_m desta espécie seja mais baixa do que a T_m das espécies do grupo 1 devido ao tamanho inferior de seu fragmento (Tabela 4.1) (Raymaekers et al., 2009; Life Technologies[®], 2012).

Nos ensaios *in vitro* com as espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus*, os iniciadores F2R2 também se mostraram específicos, pois não detectaram as bactérias filogeneticamente próximas aos micoplasmas (Figura 4.16 B), o que era esperado de acordo com a avaliação *in silico* (BLASTn[®] - NCBI[®]) da similaridade dos oligonucleotídeos com estas bactérias (Tabela 4.10). Além disso, apesar da presença de curva de amplificação no controle negativo de amplificação, não houve comprometimento da interpretação dos resultados pois o C_q foi de 39,52, um valor muito elevado e normalmente não considerado como positivo em ensaios de qPCR, e a

curva de dissociação apresentou pico em T_m de 68,01 °C, típico de dímero de iniciadores (Figura 4.16) (Raymaekers et al., 2009).

Tabela 4.10: Teste de especificidade de F2R2. Valores de C_q e T_m encontrados nas triplicatas dos ensaios de qPCR das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus* e *pool* com essas três espécies e análise *in silico* no GenBank® (NCBI®) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade com F2	Região codificante	Similaridade com R2	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	35,93	68,09				
	38,20	69,45	51,8% (CP007041)	Não codificante	69,6% (NR_074091)	16S rDNA
	35,22	68,43				
<i>C. sporogenes</i>	36,00	68,94				
	37,07	69,62	51,8% (CP011663)	Não codificante	69,6% (LC037227)	16S rDNA
	36,93	73,03	37,04% (LC037227)	16S rDNA		
<i>L. acidophilus</i>	38,76	68,94				
	37,08	69,11	51,8% (CP002559)	Não codificante	69,8% (KF738669)	16S rDNA
	38,46	69,28	33,3% (KF724889)	16S rDNA		
<i>Pool</i>	38,33	69,45				
	37,58	69,96	-	-	-	-
	38,15	69,11				

4.4.1.3- Ensaios com os iniciadores do grupo 2P (*M. pneumoniae*)

De acordo com a avaliação realizada *in silico* (BLASTn® - NCBI®) da similaridade entre os iniciadores MPF3/R3 e as sequências genômicas de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus* (Tabela 4.11), este par foi considerado específico para a detecção de *M. pneumoniae*.

A amplificação de 25 UFC de *M. pneumoniae* por qPCR *in house* com os iniciadores MPF3/R3 ocorreu em C_q 22,82 (média; dp= 0,08) e T_m 75,65 °C (média; dp= 0) (Figura 4.17).

Nas reações de amplificação de 100 UFC de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus* testados isoladamente ocorreu C_q de amplificação em 33,67 (média; dp= 0,79) e T_m 72,51 °C (média; dp= 0,42), 33,09 (média; dp= 0,58) e T_m de 81,57 °C (média; dp= 0,26) e 34,19 (média; dp= 1,25) e T_m de 72 °C (média; dp= 1,78), respectivamente (Tabela 4.11) (Figura 4.17). Apesar da ocorrência de picos com elevado valor derivativo (ΔR_n) na curva de dissociação, principalmente nos testes com *C. sporogenes*, estes não são típicos de amplificação específica, além de possuírem temperaturas distintas não só de *M. pneumoniae* mas também das outras espécies de *Mycoplasma* sp. testadas.

Tabela 4.11: Teste de especificidade de MPF3/R3. Valores de C_q e T_m encontrados nas triplicatas dos ensaios de qPCR *in house* das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus* de *pool* com essas três espécies e análise *in silico* no GenBank® (NCBI®) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade e com MP F3	Região codificante	Similaridade com MP R3	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	34,24	72,91	63,1% (HG316453)	Proteína de transporte	63,1% (HG316453)	Isoleucina t-ligase
	33,11	72,06				
	-	72,57				
<i>C. sporogenes</i>	33,30	81,29	63,1% (CP011663)	Proteína de ligação Fe-S	57,9% (CP011663)	Proteína de esporulação
	33,53	81,63			47,4% (LC037227)	16S rDNA
	32,43	81,80				
<i>L. acidophilus</i>	-	70,00	57,9% (CP010432)	Não codificante	63,1% (CP010432)	Não codificante
	35,07	73,42			42,1% (KR732278)	16S rDNA
	33,30	72,57				
<i>Pool</i>	34,54	72,40	-	-	-	-
	34,27	71,37				
	35,50	72,06				

Além disso, o elevado valor de C_q encontrados associado a essas interferências na curva de dissociação demonstram a inespecificidade da fluorescência detectada, que pode ter ocorrido devido

à ligação das moléculas de SYBR[®] Green às duplas-fitas de DNA bacteriano adicionado à reação em grande quantidade.

Nos testes com o *pool* de 100 UFC formado por estas bactérias foi possível observar C_q de amplificação em 34,77 (média; $dp= 0,64$) e T_m de 71,94 °C (média; $dp= 0,52$). De forma interessante, quando adicionados à mesma reação o DNA das três bactérias, em quantidades iguais para totalizar 100 UFC, o pico em torno de 81 °C formado na presença de *C. sporogenes* não é mais visualizado de forma significativa ($\Delta Rn < 0,5$), demonstrando a influência da quantidade de material genético desta espécie na reação de qPCR *in house* na formação de picos inespecíficos.

Como no ambiente de produção industrial não é esperado uma quantidade de contaminação elevada (Deutschmann et al., 2010) e as interferências geradas são caracteristicamente inespecíficas e distinguíveis de uma contaminação por *M. pneumoniae*, os oligonucleotídeos MPF3/R3 foram considerados específicos e adequados nos ensaios *in vitro* para a qPCR *in house*.

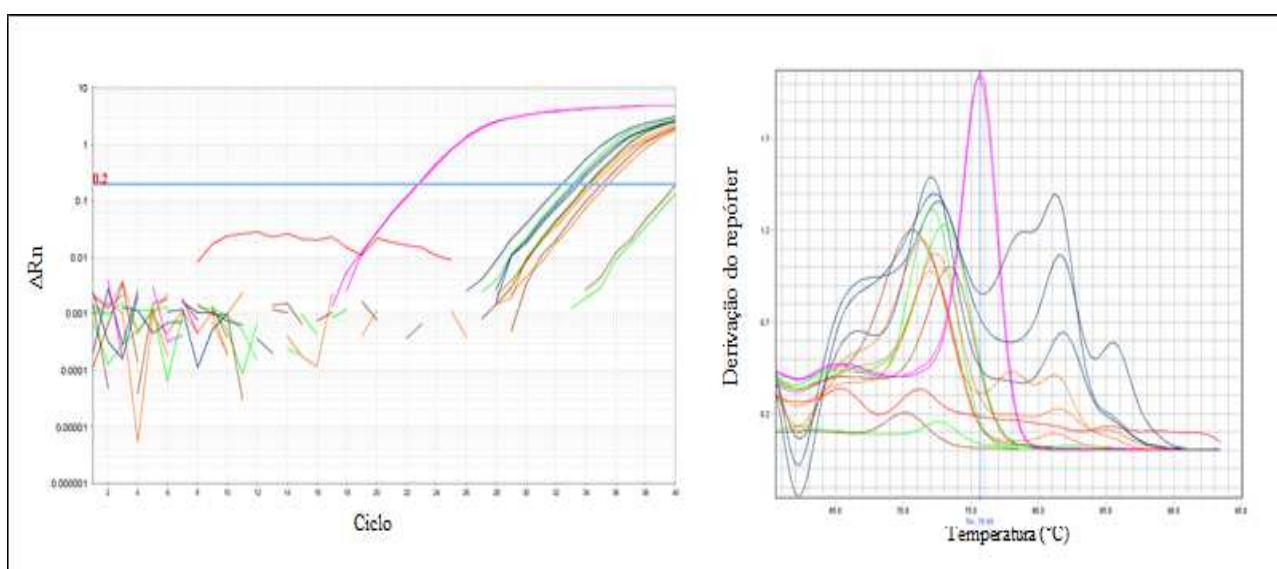


Figura 4.17: Teste de especificidade do conjunto MPF3/R3. (Da esquerda para direita). Gráfico de amplificação de 25 UFC de *M. pneumoniae* (em rosa), 100 UFC de *S. pyogenes* (em marrom), *L. acidophilus* (em verde), *C. sporogenes* (em azul), *pool* (em laranja) e controle negativo de amplificação em vermelho, e suas respectivas curvas de dissociação.

4.4.1.4- Ensaios com os iniciadores do grupo 3 (*A. laidlawii*)

A escolha do melhor par de iniciadores para a detecção de *A. laidlawii* foi realizada a partir de ensaios com cada um dos seis conjuntos desenhados, de acordo com a avaliação do perfil de amplificação deste microrganismo e da sua especificidade frente às cepas do gênero *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Clostridium* sp.

Além da ordem de testagem ter sido aleatória, os ensaios foram em duplicata e a concentração final dos iniciadores escolhida para a realização destes testes preliminares foi de 600 μM , uma vez que a otimização da reação para *A. laidlawii* não tinha sido feita pela indefinição dos melhores oligonucleotídeos para esta espécie. Essa concentração intermediária, dentre aquelas testadas nos ensaios de otimização das reações para os grupos 1, 2M e 2P, foi adotada pois não se conhecia o comportamento dos oligonucleotídeos prospectados. Além disso, como quanto maior a concentração de iniciadores, maior a chance de formação de dímeros (Raymaekers et al., 2009), o uso de 1 μM poderia dificultar a interpretação dos resultados, e conseqüentemente, a escolha do par com melhor desempenho.

O primeiro par testado foi o F3R3, que amplificou 100 UFC de *A. laidlawii* em C_q e pico único de T_m 26,16 (média; $dp= 0,002$) e 76,31 $^{\circ}\text{C}$ (média; $dp= 0,12$), respectivamente, e apresentou curva de amplificação e de dissociação no controle negativo de qPCR de 35,64 e 71,60 $^{\circ}\text{C}$ (Figura 4.18 A).

Nos ensaios com 100 UFC de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus* foram observadas curvas de amplificação das duas últimas bactérias com C_q entre 35,32 e 36,80, e formação de picos na curva de dissociação (Tabela 4.12) (Figura 4.18 B).

Tabela 4.12: Teste de especificidade de F3R3. Valores de C_q e T_m encontrados nas duplicatas dos ensaios de qPCR *in house* com 100 UFC das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus* e análise *in silico* no GenBank[®] (NCBI[®]) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade com F3	Região codificante	Similaridade com R3	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	-	61,84	57,9% (CP007562)	Região não codificante	66,7% (AJ301808)	Proteína de superfície
	-	62,01				
<i>C. sporogenes</i>	35,83	80,68	73,7% (CP011663)	16S rDNA	52,4% (CP011663)	Proteína hipotética
	36,80	79,65			42,9% (LC037227)	16S rDNA
<i>L. acidophilus</i>	35,32	78,63	57,9% (CP010432)	Região não codificante	57,1% (KP728900)	Acidocina B
	36,29	74,52	42,1% (HG518161.1)	16S rDNA	42,9% (KJ850588)	16S rDNA

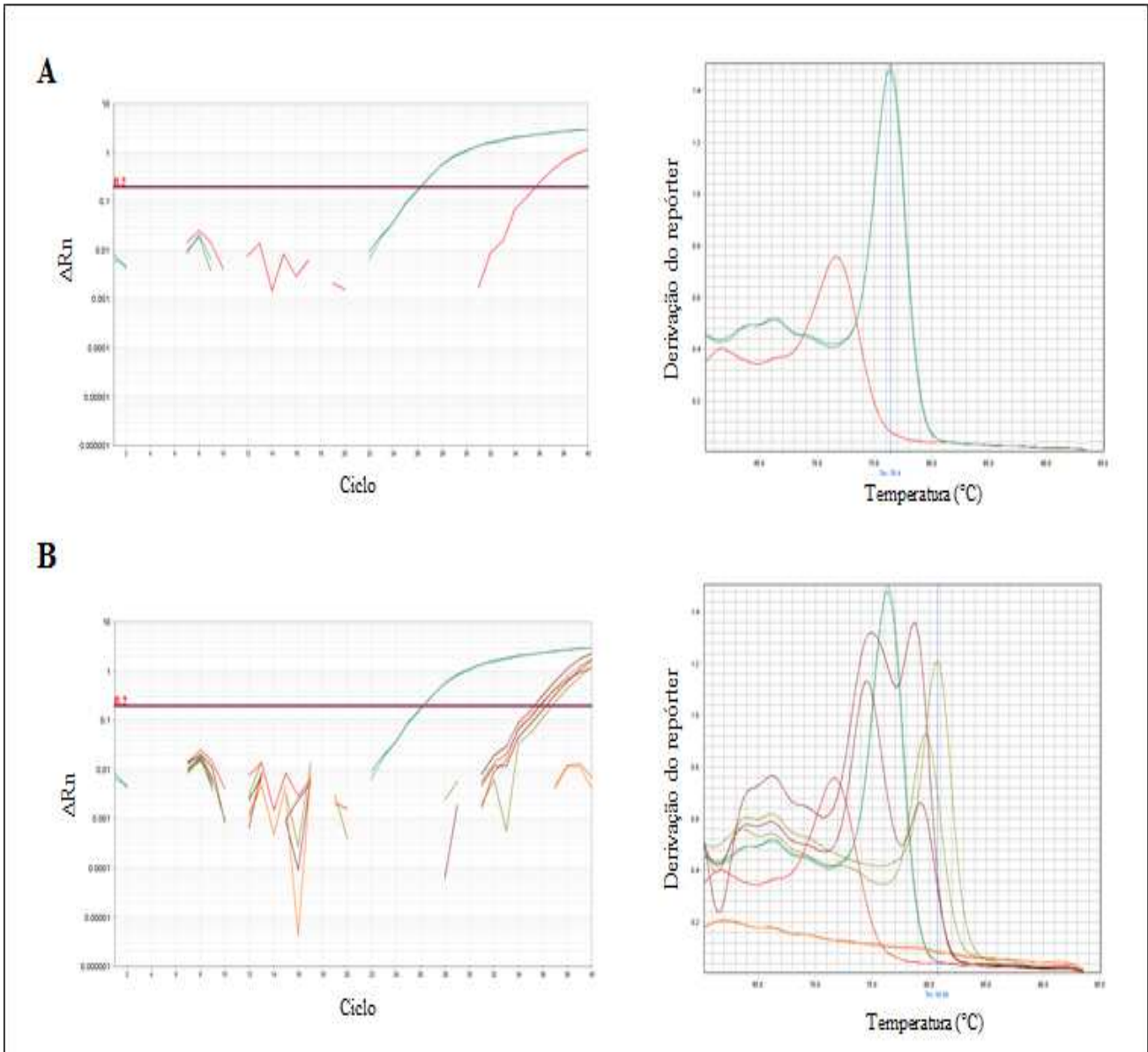


Figura 4.18: Teste de especificidade com F3R3. (Da esquerda para direita) **A:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e curva de dissociação. Em vermelho, a reação do controle negativo de qPCR. **B:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e 100 UFC de *S. pyogenes* (em laranja), *L. acidophilus* (em vinho) e *C. sporogenes* (em amarelo) e suas respectivas curvas de dissociação.

De acordo com a Tabela 4.12, foi possível observar na reação com *C. sporogenes* um pico único na curva de dissociação com T_m de aproximadamente 80 °C (figura 4.18 B). A presença dessa curva de dissociação bem definida era esperada devido a relatos na literatura sobre a proximidade filogenética entre os gêneros e à dificuldade de prospectar iniciadores específicos para a classe *Clostridium* (Weisburg et al., 1989; Bóve, 1993; Wolf et al., 2004). Além disso, através da análise *in silico*, foi previsto que o percentual de similaridade entre o iniciador F3 prospectado e a região 16S rDNA desta bactéria era acima de 70%, sugerindo a possibilidade de amplificação dessa região.

Como a ocorrência da amplificação exponencial do alvo depende da atividade de ambos os iniciadores, e o anti-senso R3 possui similaridade com esta bactéria abaixo de 50%, foi possível que tenha ocorrido apenas a amplificação do fragmento pelo iniciador senso. Isso justifica o elevado C_q encontrado e a curva de dissociação ter pico bem definido (não sugestivo de dímero ou amplificação inespecífica).

Apesar de na época não ter sido estabelecido o *cut-off* da reação em relação ao C_q , o valor de aproximadamente 35 encontrado na reação do controle negativo de qPCR, aliado ao fato de que valores elevados de C_q são rotineiramente considerados negativos (Bustin et al., 2009; Caraguel et al., 2011), sugeriu-se que esse poderia ser o ponto de corte para a interpretação dos resultados para este par de iniciadores. Assim, por análise de C_q , os resultados obtidos com *C. sporogenes* foram considerados negativos.

É possível também que a fluorescência detectada, tantos nos casos de *Clostridium* e *Lactobacillus*, seja devido à capacidade do SYBR[®] Green de se ligar a qualquer dupla fita de DNA (Life Technologies[®], 2012). Neste caso, a grande quantidade de DNA adicionada à reação (correspondente a 100 UFC) poderia ter gerado a emissão de fluorescência ou até mesmo ter servido de molde para a ligação de pelo menos um dos iniciadores - mesmo sem a ocorrência de amplificação, uma vez que existem mais de uma região para o pareamento.

Entretanto, como a liberação de um resultado positivo depende da análise do perfil de amplificação em associação com a curva de dissociação (Life Technologies[®], 2012), e o C_q em que houve a detecção de sinal fluorescente das bactérias filogeneticamente próximas aos micoplasmas foi acima de 35 e as T_m das curvas de dissociação dessas bactérias diferem da T_m de *A. laidlawii*, e este par de iniciadores foi adotado como um candidato para seu uso na qPCR *in house*.

O segundo conjunto a ser testado foi o F3R4, que de acordo com a figura 4.19, amplificou 5 UFC de *A. laidlawii*, com C_q em 29,6 (média; dp= 0,19) e pico único na curva de dissociação com T_m em 76,6 °C (média; dp= 0,12). Além de não ter ocorrido amplificação no controle negativo de qPCR, o par de iniciadores não amplificou *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus* (Figura 4.19) (Tabela 4.13).

Apesar do fragmento formado por este conjunto ter 204 pb e a energia para a formação de heterodímero ser de -6,21 kcal/mol (Integrated DNA Technologies[®]), o seu desempenho nas reações de qPCR *in house* foi satisfatório e, por isso, o par F3R4 também foi selecionado para os testes subsequentes para a escolha do melhor iniciador para a detecção de *A. laidlawii*.

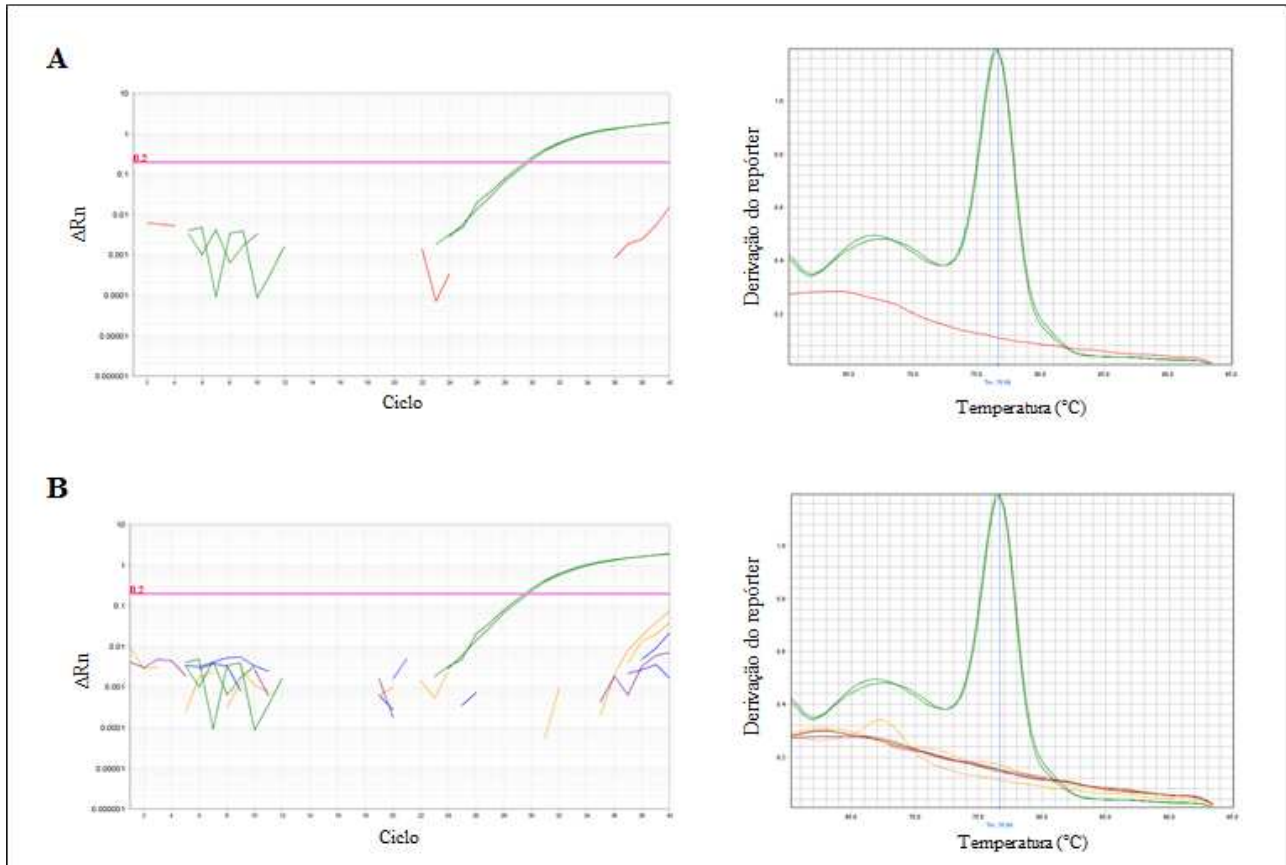


Figura 4.19: Teste de especificidade com F3R4. (Da esquerda para direita) **A:** Gráfico de amplificação de 10 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e controle negativo de qPCR (em vermelho) e suas respectivas curvas de dissociação. **B:** Gráfico de amplificação de 10 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e 100 UFC de *S. pyogenes* (em laranja), *L. acidophilus* (em azul) e *C. sporogenes* (em roxo) e suas respectivas curvas de dissociação.

Tabela 4.13: Teste de especificidade de F3R4. Valores de C_q e T_m encontrados nas duplicatas dos ensaios de qPCR *in house* com 100 UFC das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus* e análise *in silico* no GenBank[®] (NCBI[®]) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade com F3	Região codificante	Similaridade com R4	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	-	64,14	57,9% (CP007562)	Região não codificante	63,2% (CP007241)	Não codificante
	-	63,26			52,6% (HM241928)	16S rDNA
<i>C. sporogenes</i>	-	67,27	73,7% (CP011663)	16S rDNA	63,2% (CP011663)	ATPse AAA
	-	-			42,1% (LC037227)	16S rDNA
<i>L. acidophilus</i>	-	62,57	57,9% (CP010432) 42,1% (HG518161.1)	Região não codificante 16S rDNA	63,2% (CP002559)	Não codificante
	-	-			42,1% (HE793099)	16S rDNA

Nos ensaios com o par F3R5, a amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* ocorreu no C_q 29,35 (média; $dp= 0,18$) e pico único na curva de dissociação com T_m de 77,52 °C (média; $dp=0,12$). Entretanto, o perfil da sua curva de amplificação foi atípica, com descontinuidade de traçado e a sua curva de dissociação não apresentou um pico bem formado, com base estreita típica de qPCR com SYBR[®] Green (Raymaekers et al., 2009), como o obtido com os conjuntos F3R3 e F3R4 (Figura 4.20 A).

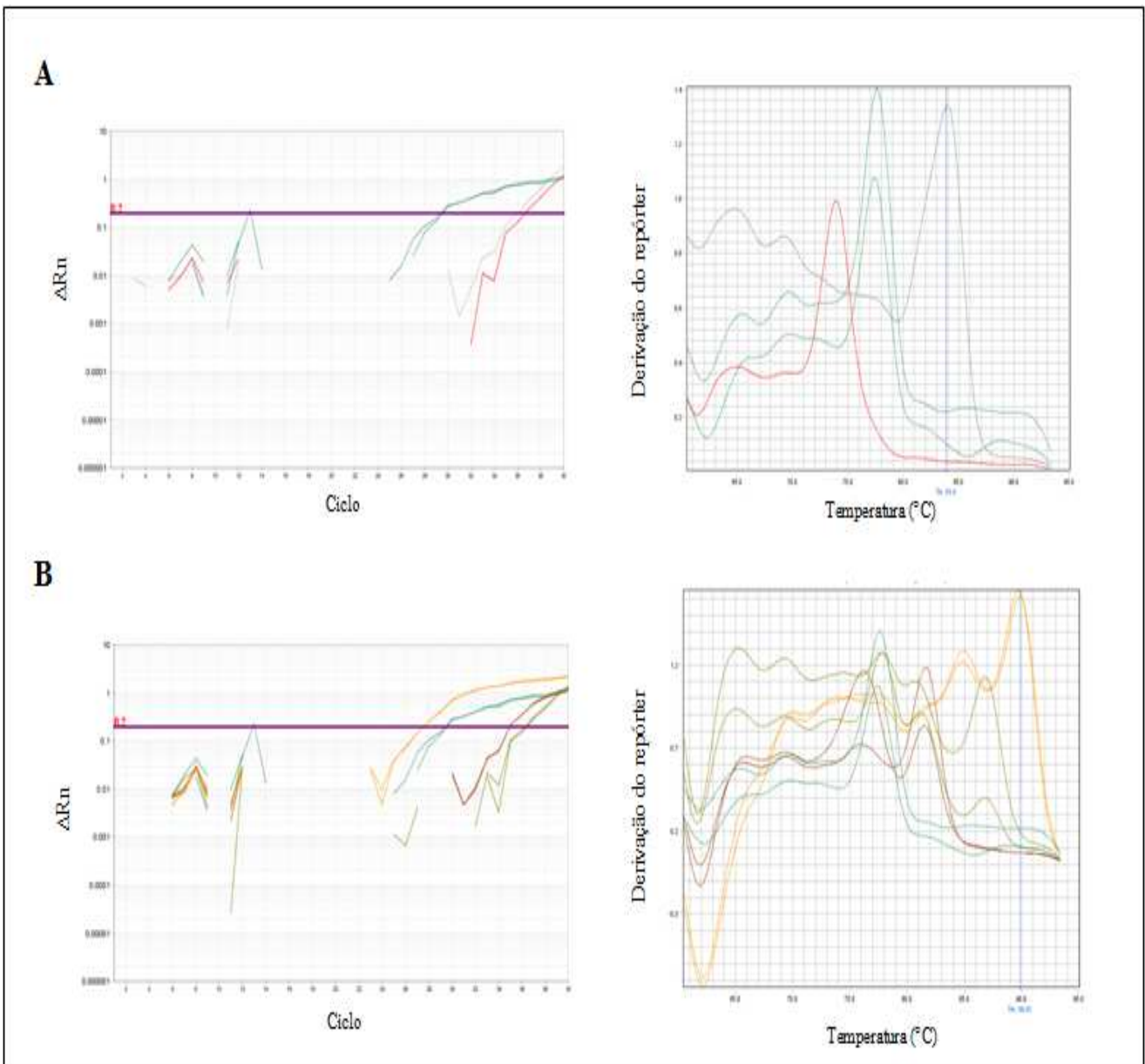


Figura 4.20: Teste de especificidade com F3R5. (Da esquerda para direita) **A:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde escuro), controle negativo de qPCR (em vermelho) e controle de extração (em cinza), e suas respectivas curvas de dissociação. **B:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde escuro) e 100 UFC de *S. pyogenes* (em laranja), *L. acidophilus* (em vinho) e *C. sporogenes* (em verde claro) e suas respectivas curvas de dissociação.

Dentre as bactérias filogeneticamente relacionadas aos micoplasmas testados, a espécie *S. pyogenes* apresentou C_q inferior ao de *A. laidlawii* (média= 27,64; dp= 0,01) porém, com T_m de 89,74 °C (média; dp= 0,12) e múltiplos picos na curva de dissociação. De acordo com o gráfico da figura 4.20 B, parece ter ocorrido reação de amplificação, entretanto, ela não pode ser afirmada devido ao percentual de similaridade entre esta bactéria e os iniciadores não ser elevado, e à região de pareamento dos oligonucleotídeos serem distintas (Tabela 4.14). Ainda, avaliando os iniciadores em relação à região 16S rDNA de *S. pyogenes*, não foi possível prever o pareamento *in silico* de acordo com a ferramenta BLASTn[®] (NCBI[®]). Apesar disso, a presença de C_q de amplificação e múltiplos picos na curva de dissociação pode ser justificada pela capacidade de ligação inespecífica do SYBR[®] Green à qualquer dupla fita de DNA, como o DNA bacteriano que estava em grande quantidade na reação (100 UFC) ou resultado gerado pela ligação entre os iniciadores e o DNA, ou ainda, produto inespecífico formado.

Tabela 4.14: Teste de especificidade de F3R5. Valores de C_q e T_m encontrados nas duplicatas dos ensaios de qPCR *in house* com 100 UFC das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus*, e análise *in silico* no GenBank[®] (NCBI[®]) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade com F3	Região codificante	Similaridade com R5	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	27,65	89,66	57,9% (CP007562)	Região não codificante	61,9% (CP007241)	Região não codificante
	27,63	89,83				
<i>C. sporogenes</i>	36,31	86,87	73,7% (CP011663)	16S rDNA	66,7% (CP011663)	Permease transportadora de antibiótico
	36,50	77,79			38,1% (LC037227)	16S rDNA
<i>L. acidophilus</i>	35,01	81,63	57,9% (CP010432)	Região não codificante	57,1% (CP010432)	Região não codificante
	35,03	76,21	42,1% (HG518161.1)	16S rDNA	38,1% (KC161295)	16S rDNA

Nos testes com *L. acidophilus* e *C. sporogenes* foi possível observar também múltiplos picos inespecíficos na curva de dissociação, porém com C_q 35,02 (média; dp= 0,01) e 36,40 (média; dp= 0,13), respectivamente. Conforme descrito na tabela 4.14, como o percentual de similaridade entre os iniciadores do conjunto e esta bactéria não é elevado, e as regiões de pareamento são distintas, é pouco provável que tenha ocorrido amplificação. Da mesma forma como com *S. pyogenes*, a presença de C_q de amplificação e múltiplos picos na curva de dissociação podem ser justificadas pela capacidade de ligação inespecífica do SYBR[®] Green.

Comparando os resultados de F3R5 com o perfil de amplificação de *A.laidlawii* pelo par F3R3 descrito anteriormente: a) o par F3R5 mostrou um pior desempenho na reação, pois amplificou 100 UFC de *A. laidlawii* com 3 C_q de diferença e b) parece ter gerado amplificação inespecífica e não esperada (de acordo com a prospecção de iniciadores) na reação com *S. pyogenes*. Portanto, este conjunto foi descartado para os testes subsequentes.

O quarto conjunto testado foi o F4R3, que amplificou 100 UFC de *A. laidlawii* em C_q 29,32 (média; $dp= 0,08$) e apresentou na curva de dissociação da espécie alvo, além do pico específico em T_m 79,09 °C (média; $dp= 0,12$), um pico de menor intensidade de sinal em T_m 71,59 °C (média; $dp= 0,12$) (Figura 4.21 A). Este pico secundário, com valor de ΔRn elevado (quando comparado com o do pico principal), é sugestivo de formação de dímero de iniciadores, conforme previsão de -6,21 kcal/mol pelo programa IDT OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies®) (Tabela 4.3). Além disso, não houve amplificação nos ensaios com as bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Clostridium* sp. (Figura 21B), corroborando os dados descritos na Tabela 4.15.

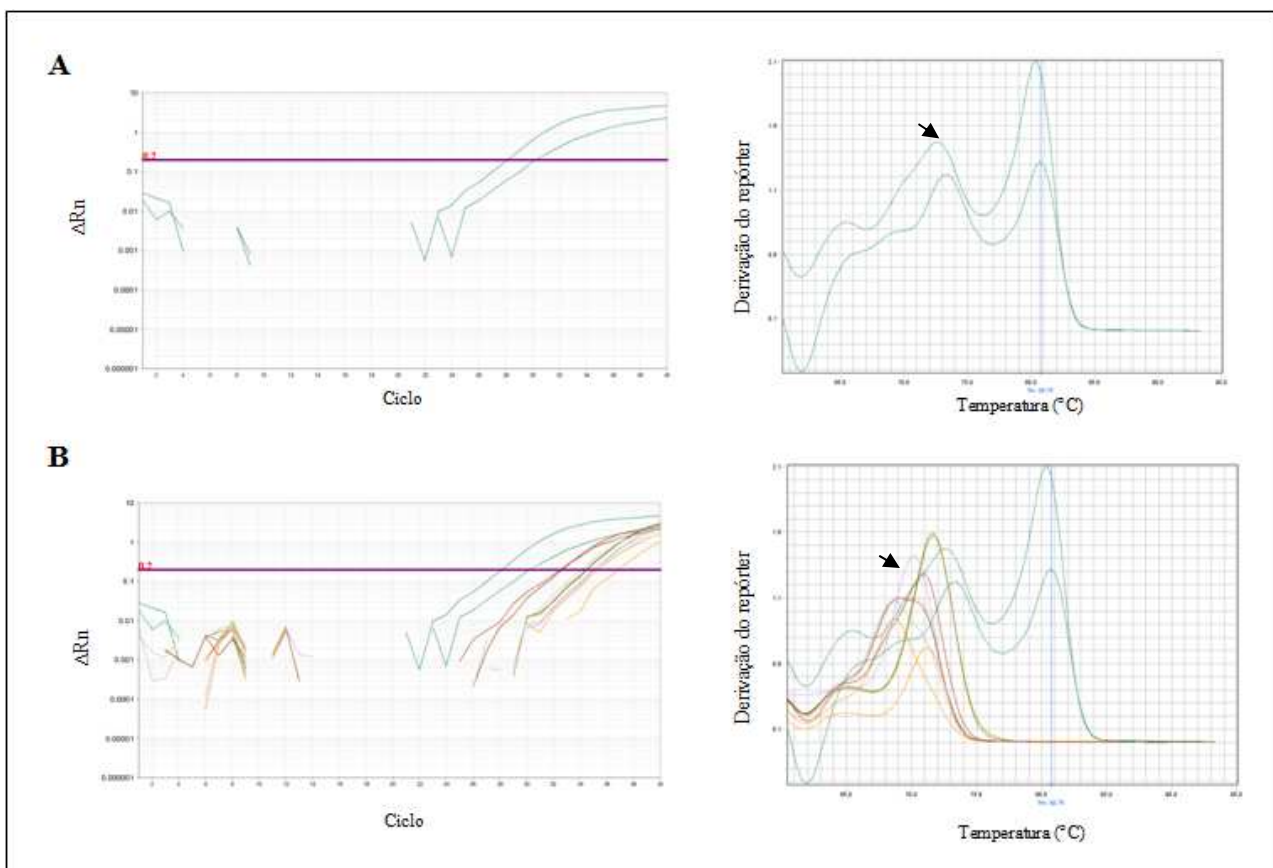


Figura 4.21: Teste de especificidade com F4R3. (Da esquerda para direita) **A:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e curva de dissociação. Em destaque na ponta da seta um pico secundário em T_m 71,58° C sugestivo de dímero de iniciador. **B:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e 100 UFC de *S. pyogenes* (em laranja), *L. acidophilus* (em vinho) e *C. sporogenes* (em amarelo) e suas respectivas curvas de dissociação. Na ponta da seta a curva de dissociação do controle negativo de qPCR (em lilás).

Tabela 4.15: Teste de especificidade de F4R3. Valores de C_q e T_m encontrados nas duplicatas dos ensaios de qPCR *in house* com 100 UFC das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus* e análise *in silico* no GenBank® (NCBI®) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade com F4	Região codificante	Similaridade com R3	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	36,86	71,15	64,3% (CP011415)	Não codificante	66,7% (AJ301808)	Proteína de superfície
	35,28	68,71				
<i>C. sporogenes</i>	34,48	71,67	50% (CP011663)	Proteína ligadora de ferro-enxofre	52,4% (CP011663)	Proteína hipotética
	34,51	71,67	32,1% (EU333998)	16S rDNA	42,9% (LC037227)	16S rDNA
<i>L. acidophilus</i>	32,69	70,80	50% (CP002559)	Não codificante	57,1% (KP728900)	Acidocina B
	32,53	69,06	32,1% (KC161295)	16S rDNA	42,9% (KJ850588)	16S rDNA

Apesar da formação dos dímeros não interferir na análise dos resultados, estes podem prejudicar a eficiência da reação, uma vez que pareados entre si, eles não estariam totalmente disponíveis para o alvo, e diminuir consequentemente a sensibilidade do teste (Elnifro et al., 2000; Bustin et al., 2007). Além disso, como havia a intenção de padronizar um ensaio único multiplex com os iniciadores prospectados para os três grupos, este conjunto foi descartado para os testes subsequentes, devido à elevada complementariedade que o iniciador F4 tem com os iniciadores R1 (grupo 1) e R2 (grupo 2): -8,02 kcal/ mol, 3 bases CG e 1 AT (Tabela 4.3).

O conjunto F4R4 obteve resultados similares com o F4R3 na amplificação de *A. laidlawii*, com C_q de 28,77 e apresentando pico secundário com valor de ΔRn inferior ao pico específico, com T_m de 71,39 e 79,13 °C, respectivamente (Figura 4.22 A). Entretanto, este par se mostrou mais adequado do que F4R3 por não apresentar C_q de amplificação com as espécies do gênero *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp. e *Clostridium* sp. (Tabela 4.16), e de acordo com os gráficos de amplificação, não houve curva de amplificação do controle negativo de qPCR, mostrando a ausência de dímeros de iniciador significativos (Figura 4.22 B).

De forma interessante, assim como em F4R3, a energia para a formação de heterodímeros é de -6,21 kcal/mol (Integrated DNA Technologies®). Conforme já foi discutido anteriormente, a presença de dímeros nas reações de qPCR podem prejudicar a sensibilidade do teste, e por isso este par também foi descartado.

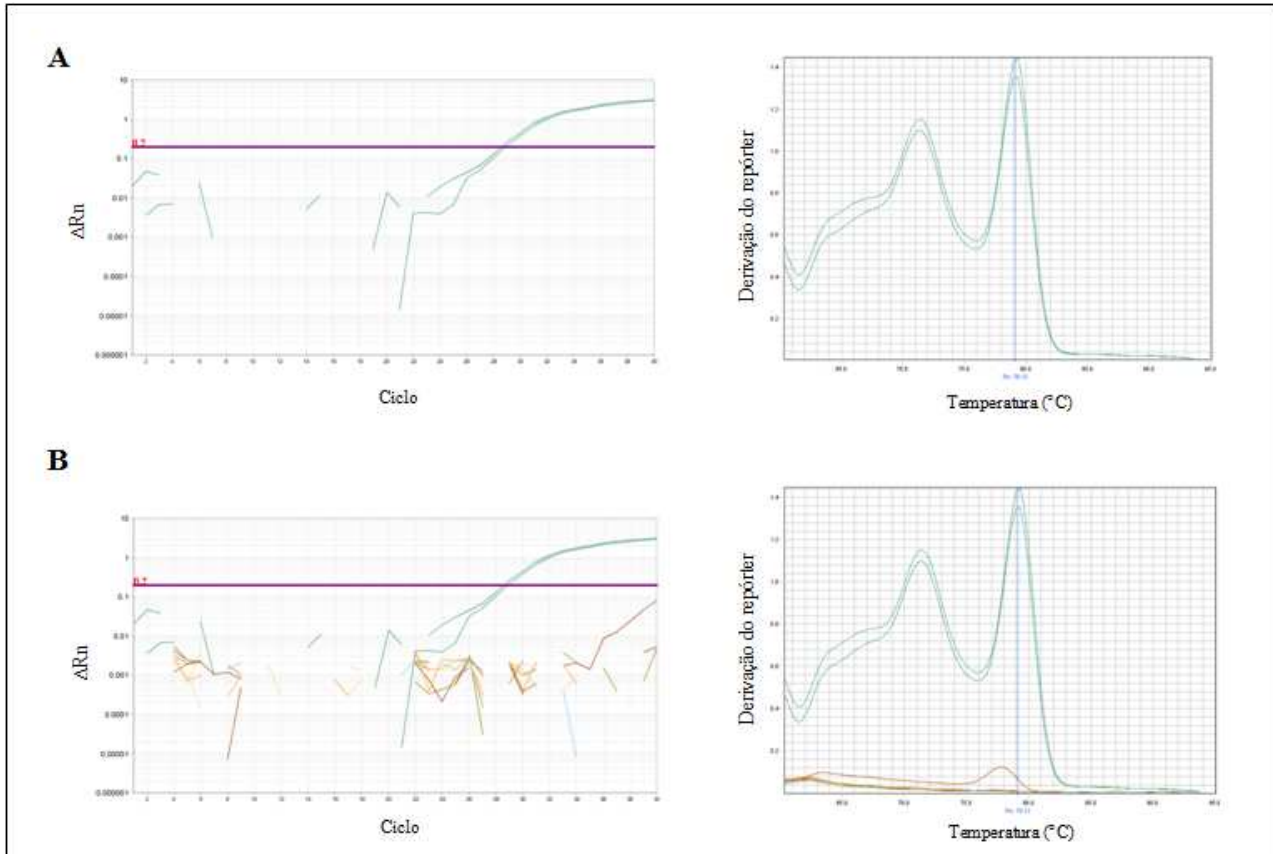


Figura 4.22: Teste de especificidade com F4R4. (Da esquerda para direita) **A:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e sua respectiva curva de dissociação. **B:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e 100 UFC de *S. pyogenes* (em laranja), *L. acidophilus* (em vinho) e *C. sporogenes* (em verde claro) e controle negativo de qPCR (em vermelho) e suas respectivas curvas de dissociação.

Tabela 4.16: Teste de especificidade de F4R4. Valores de C_q e T_m encontrados nas duplicatas dos ensaios de qPCR *in house* com 100 UFC das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus*, e análise *in silico* no GenBank® (NCBI®) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade com F4	Região codificante	Similaridad e com R4	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	-	61,95	64,3% (CP011415)	Não codificante	63,2% (CP007241)	Não codificante
	-	61,95			52,6% (HM241928)	16S rDNA
<i>C. sporogenes</i>	-	61,95	50% (CP011663) 32,1% (EU333998)	Proteína ligadora de ferro-enxofre 16S rDNA	63,2% (CP011663)	ATPse AAA
	-	61,95			42,1% (LC037227)	16S rDNA
<i>L. acidophilus</i>	-	77,75*	50% (CP002559) 32,1% (KC161295)	Não codificante 16S rDNA	63,2% (CP002559)	Não codificante
	-	62,12			42,1% (HE793099)	16S rDNA

*valor de ΔRn muito baixo.

O último conjunto testado foi o F4R5, que apresentou tanto o perfil de amplificação quanto a curva de dissociação similar ao obtido com o par F4R4, pois o C_q correspondente a 100 UFC de *A. laidlawii* foi de 28,41 (média; dp= 0,02) e a curva de dissociação com um pico secundário em T_m 71,39 °C e pico específico em T_m 79,21 °C (média; dp= 0,12) (Figura 4.23 A). Apesar da necessidade da energia para a formação de heterodímeros ser alta (Tabela 4), outras três bases dos iniciadores em sequência são complementares (Figura 4.23 C), o que pode justificar a ocorrência deste evento.

Através da tabela 4.17 e figura 4.23 B foi possível observar que o conjunto F4R5, assim como F4R4, também não amplificou nenhuma das três bactérias preconizadas pela FE para os testes de especificidade (não apresentou C_q no gráfico de amplificação e a curva de dissociação foi típica de dímero de iniciador). Adicionalmente, o controle negativo de qPCR não apresentou curva de amplificação ou formação de dímeros com valor de ΔRn elevados.

Tabela 4.17: Teste de especificidade de F4R5. Valores de C_q e T_m encontrados nas duplicatas dos ensaios de qPCR *in house* com 100 UFC das espécies de *S. pyogenes*, *C. sporogenes*, *L. acidophilus*, e análise *in silico* no GenBank® (NCBI®) do percentual de similaridade e região de pareamento dos iniciadores senso e anti-senso.

Espécie testada	C_q	T_m	Similaridade com F4	Região codificante	Similaridade e com R5	Região codificante
<i>S. pyogenes</i>	39,71	63,66	64,3% (CP011415)	Não codificante	61,9% (CP007241)	Região não codificante
	-	63,84				
<i>C. sporogenes</i>	-	62,29	50% (CP011663) 32,1% (EU333998)	Proteína ligadora de ferro-enxofre 16S rDNA	66,7% (CP011663) 38,1% (LC037227)	Permease transportadora de antibiótico 16S rDNA
	-	62,29				
<i>L. acidophilus</i>	-	62,12	50% (CP002559) 32,1% (KC161295)	Não codificante 16S rDNA	57,1% (CP010432) 38,1% (KC161295)	Região não codificante 16S rDNA
	-	62,29				

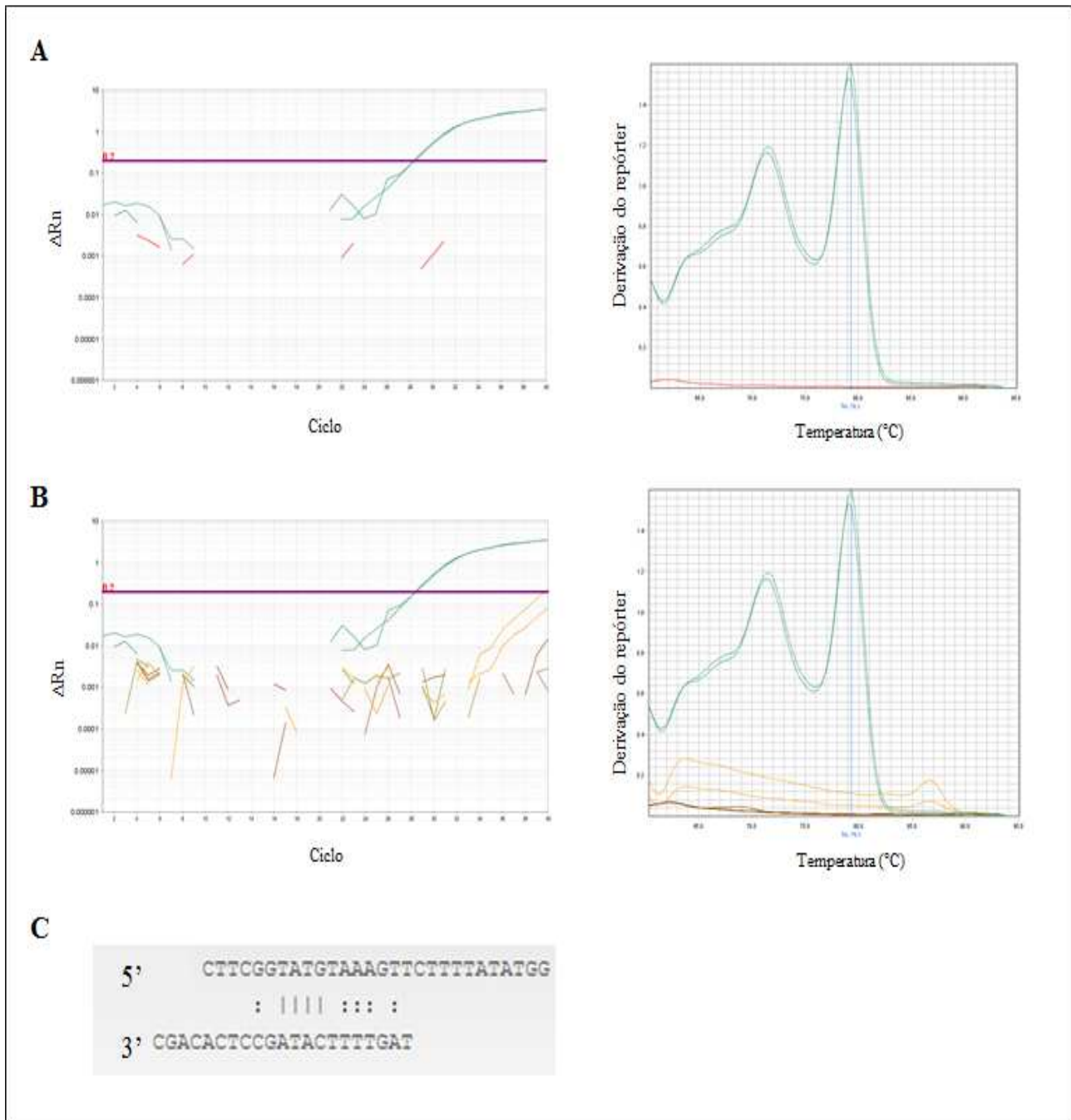


Figura 4.23: Teste de especificidade com F4R5. (Da esquerda para direita) **A:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e o controle negativo de qPCR (em vermelho) e suas respectivas curvas de dissociação. **B:** Gráfico de amplificação de 100 UFC de *A. laidlawii* (em verde) e 100 UFC de *S. pyogenes* (em laranja), *L. acidophilus* (em vinho) e *C. sporogenes* (em verde claro) e suas respectivas curvas de dissociação. **C:** Formação de heterodímero entre F4 e R5.

Considerando os resultados obtidos com os seis conjuntos testados para a detecção de *A. laidlawii*, resumidos na Tabela 4.18, os pares F3R3 e F3R4 foram os que obtiveram melhor desempenho quanto à análise de curva de dissociação (formação de pico único) e menores valores de C_q . Para a escolha dos melhores oligonucleotídeos, estes conjuntos foram testados em multiplex com os pares F1R1 e F2R2.

Tabela 4.18: Resultados obtidos nos ensaios de especificidade com os seis conjuntos de iniciadores prospectados para detecção de *A. laidlawii* por qPCR.

Iniciadores	Fragmento (pb)	Heterodímero (kcal/mol)	C _q de <i>A. laidlawii</i>	T _m (°C)	Pico único	<i>S. pyogenes</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>L. acidophilus</i>
F3R3	189	-3,14 (2 bases)	26,16	76,31	Sim	-	Sim (>35)	Sim (>35)
F3R4	204	-6,21 (3 bases)	29,6 [!]	76,51	Sim	-	-	-
F3R5	210	-4,67 (3 bases)	29,35	77,52	Sim	27,64 [*]	Sim (>35)	Sim (>35)
F4R3	87	-6,2 (5 bases)	29,33	79,09	Não	Sim (>35)	34,5 [#]	32,61 ^{&}
F4R4	102	-4,39 (4 bases)	28,77	79,13	Não	-	-	-
F4R5	108	-4,39 (4 bases [@])	28,41	79,21	Não	Sim (>35)	-	-

[@] apesar de serem quatro bases complementares, existem outras três bases muito próximas se ligando, favorecendo a formação de dímero;

[!] C_q de amplificação referente a 5 UFC de *A. laidlawii*;

^{*} curva de dissociação com pico único em T_m de 89,74 °C (média);

[#] curva de dissociação com picos múltiplos com maior T_m em 71,67 °C (média);

[&] curva de dissociação com picos múltiplos com maior T_m em 69,93 °C (média).

4.4.1.5- Ensaios multiplex para escolha dos iniciadores de *A. laidlawii*

Nos ensaios multiplex F1F2F3/ R1R2R3 e F1F2F3/R1R2R4 foram testados 5 UFC de *A. laidlawii* e 100 UFC de *S. pyogenes*, *C. sporogenes* e *L. acidophilus*. De acordo com a análise da curva de dissociação na figura 4.24, o conjunto que melhor amplificou *A. laidlawii* foi F3R4, pois a curva apresentou pico único e bem definido em T_m 76,51 °C (média; dp= 0,12). Entretanto, nos ensaios com *Clostridium* e *Lactobacillus*, além de valor de C_q muito próximo do alvo (Tabela 4.19), as curvas de dissociação apresentaram picos limpos e únicos sugestivos de amplificação e que poderiam ser confundidos com uma contaminação por outra espécie de micoplasma, como o *M. orale* que apresentou em ensaios anteriores T_m aproximadamente de 78 °C (Figura 4.24). Assim, os

oligonucleotídeos F3R3 foram escolhidos para os ensaios de qPCR com o protocolo *in house* para a detecção de *A. laidlawii*.

Dessa forma, contrariamente a iniciadores prospectados em trabalhos anteriores (Spaepen et al., 1993; Teyssou et al., 1993; Deutschmann et al., 2010), os iniciadores do grupo 1 – F1 e R1, do grupo 2M- F2 e R2, do grupo 2P - MPF3 e MPR3 e do grupo 3- F3 e R3, foram considerados específicos para a detecção de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii*.

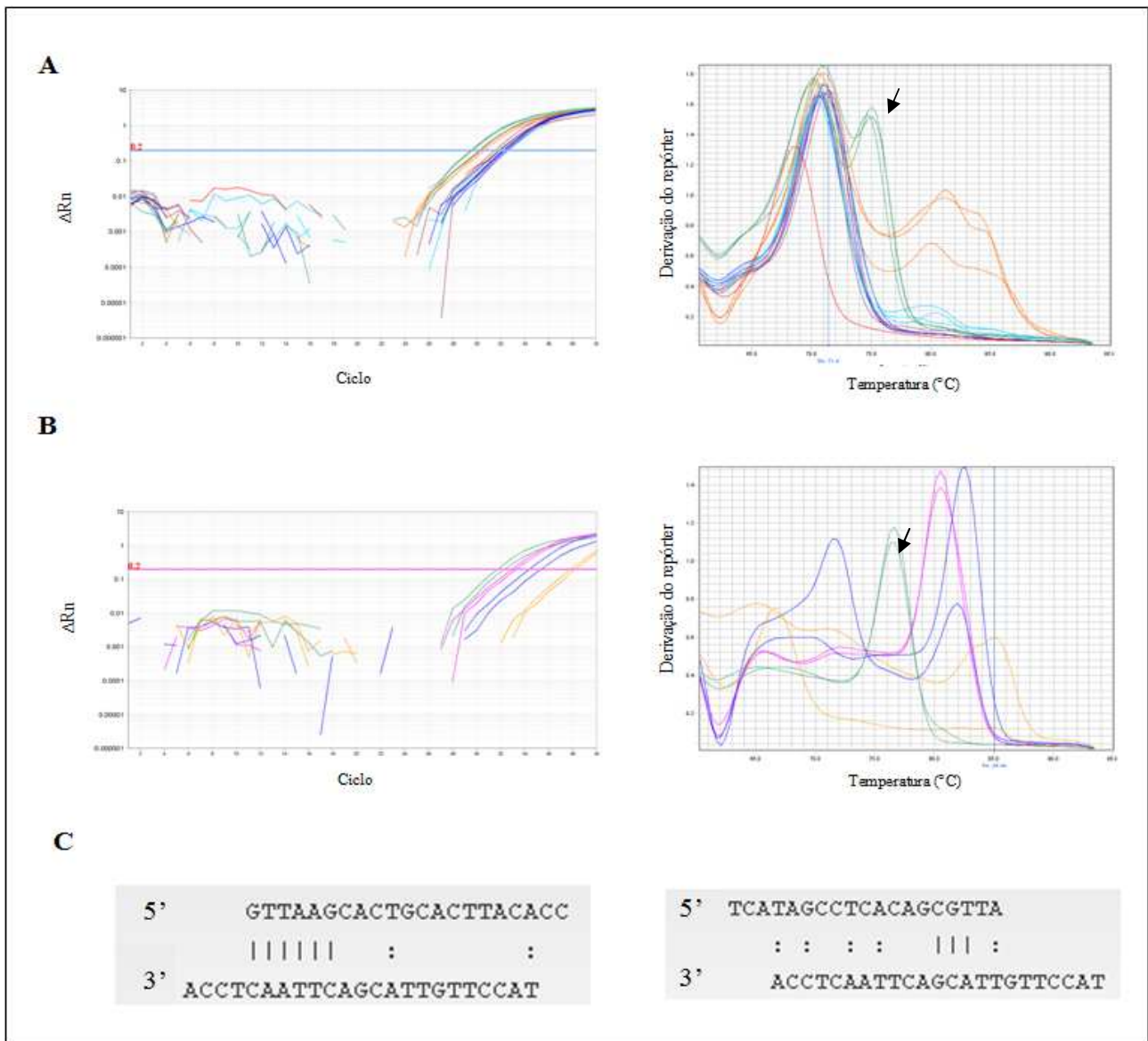


Figura 4.24: Ensaio de especificidade multiplex para a escolha dos iniciadores de *A. laidlawii*. **A:** Ensaio de especificidade multiplex com F1R1, F2R2 e F3R3. Gráfico de amplificação de 5 UFC de *A. laidlawii* (verde- ponta da seta) e 100 UFC de *S. pyogenes* (roxo), *C. sporogenes* (laranja), *L. acidophilus* (azul escuro), testados individualmente, ou em *pool* (azul claro). **B:** Ensaio de especificidade multiplex com F1R1, F2R2 e F3R4. Gráfico de amplificação de 5 UFC de *A. laidlawii* (verde- ponta da seta) e 100 UFC de *S. pyogenes* (amarelo), *C. sporogenes* (rosa) e *L. acidophilus* (azul). **C:** Análise *in silico* da formação de dímeros entre os iniciadores R3 e R2 (esquerda) e R4 e R2 (direita) (IDT Oligonalyzer[®]).

Tabela 4.19: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de especificidade multiplex com os iniciadores do grupo 1 (F1R1), grupo 2M (F2R2) e grupo 3 (F3R3 e F3R4).

Espécie testada	F1F2F3/ R1R2R3		F1F2F3/R1R2R4	
	C_q	T_m	C_q	T_m
<i>A. laidlawii</i>	29,58	74,66	29,73	76,51
	29,52	75,01	29,47	76,51
<i>S. pyogenes</i>	31,49	70,72	38,16	66,58
	31,85	70,72	37,83	85,06
<i>C. sporogenes</i>	30,63	70,89	32,95	80,52
	30,29	70,55	33,32	80,52
<i>L. acidophilus</i>	32,26	70,55	35,32	71,63
	32,60	71,06	34,40	82,44*

* pico secundário em T_m 81,92 °C.

4.4.2- Ensaios de exclusividade entre os iniciadores e micoplasmas

Uma vez que o *locus* 16S rDNA bacteriano é uma região genômica conservada e foi a escolhida para a prospecção dos iniciadores, foram feitos ensaios testando os pares desenhados com o DNA das bactérias que não pertenciam ao seu grupo específico, de forma a avaliar a capacidade de cada conjunto de amplificar outras espécies além daquelas consideradas como alvo.

4.4.2.1- Ensaios com F1R1

De acordo com a figura 4.25 o par F1R1, responsável pela amplificação de *M. orale* e *M. synoviae*, *M. fermentans*, *M. arginini* e *M. hyorhinis*, não foi capaz de amplificar 25 UFC das

espécies *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae* e *A. laidlawii*, testadas isoladamente ou em *pool* (5 UFC de cada bactéria).

Apesar dos valores de C_q de amplificação das três espécies não pertencentes ao grupo 1 terem sido a partir de aproximadamente 32, as curvas de dissociação não foram típicas de amplificação específica e as T_m encontradas eram distintas do alvo (Tabela 4.20) (Figura 4.25). A ausência de amplificação era esperada de acordo com a análise *in silico* do percentual de similaridade entre os iniciadores e as três espécies de micoplasmas (Tabela 4.21), e pela região de pareamento não incluir as últimas cinco bases dos oligonucleotídeos, que conferem a estabilidade do oligonucleotídeo para a amplificação (PREMIER Biosoft[®], 2015).

Ainda, comparando a reação de amplificação do *pool* formado pelas cinco espécies de micoplasmas e *M. synoviae* testado individualmente, foi observada uma diferença de C_q aproximadamente 3, o que não era esperado pois o *pool* continha DNA alvo correspondente a 10 UFC (5 UFC de *M. synoviae* e 5 UFC *M. orale*), enquanto a reação com *M. synoviae* isoladamente foi realizada com DNA correspondente a 25 UFC.

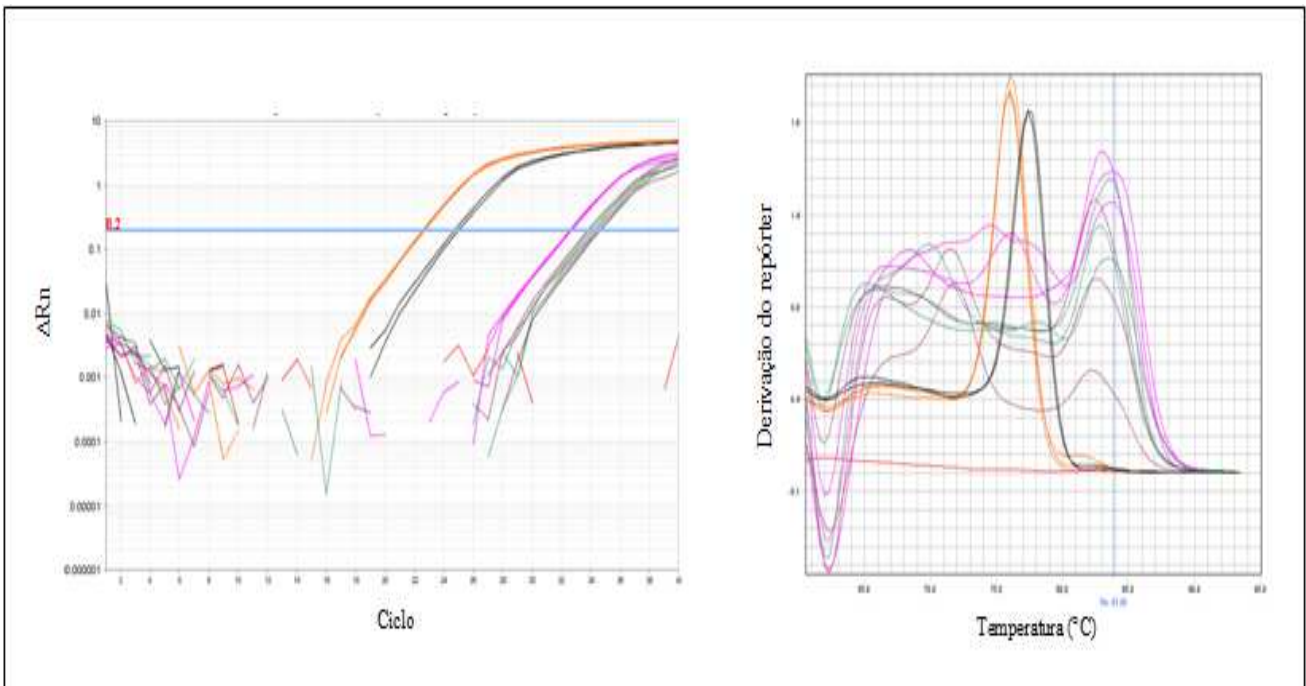


Figura 4.25: Teste de exclusividade entre os micoplasmas e o par F1R1. (Da esquerda para a direita) Gráfico de amplificação de 25 UFC de *M. synoviae* (em preto), *pool* com *M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae* e *A. laidlawii* (5 UFC de cada bactéria) (laranja) e 25 UFC de *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae* e *A. laidlawii* testadas individualmente (demais cores), e suas respectivas curvas de dissociação. Controle negativo de amplificação em vermelho.

Tabela 4.20: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de F1R1 com 25 UFC de *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae*, *A. laidlawii*, pool formado com estas espécies e *M. orale* (totalizando 25 UFC).

Microrganismo	C_q	T_m
<i>M. gallisepticum</i>	33,85	82,49
	34,57	71,71
	34,23	82,49
<i>M. pneumoniae</i>	32,69	83,85
	32,71	83,00
	32,61	83,68
<i>A. laidlawii</i>	34,43	69,83
	34,01	83,51
	34,71	82,83
Pool micoplasmas	22,70	75,99
	22,63	76,16
	22,70	75,99
<i>M. synoviae</i>	25,06	77,36
	24,78	77,53

Tabela 4.21: Percentual de similaridade entre os iniciadores do par F1R1 e outras espécies de micoplasma preconizadas pela FE 7.0 (BLASTn[®]-NCBI[®]).

Espécie de micoplasma	Similaridade			
	F1	Região codificante	R1	Região codificante
<i>M. gallisepticum</i>	66,7% (KC995374)	16S rDNA	66,7% (KC995374)	16S rDNA
<i>M. pneumoniae</i>	66,7% (NR_074554)	16S rDNA	66,7% (NR_074554)	16S rDNA
<i>A. laidlawii</i>	66,7% (KM280692)	16S rDNA	72,2% (KM280692)	16S rDNA

4.4.2.2- Ensaios com F2R2

Apesar de ter sido definido que o par F2R2 seria específico apenas para *M. gallisepticum*, já havia sido observada a sua capacidade de amplificar *M. pneumoniae*, porém gerando fragmento com T_m inferior (Figura 4.14 e 4.16). Assim, neste ensaio foi testado, além de 25 UFC *M. gallisepticum* isoladamente como controle positivo do teste, a mesma quantidade de *M. pneumoniae*.

De acordo com a figura 4.26, não ocorreu amplificação de *M. gallisepticum*, sugerindo uma possível degradação do material genético vista em experimentos anteriores (dados não mostrados). Porém, o ensaio não foi invalidado devido à amplificação de *M. pneumoniae*, em C_q 27,67 (média; $dp= 0,04$) e T_m 73,71 °C (média; $dp= 0,24$).

A partir dos dados descritos na tabela 4.22, era esperada a ausência de amplificação das espécies do grupo 1. Nos ensaios *in vitro*, esses dados foram confirmados com a ausência de amplificação de 25 UFC de *M. orale*- C_q 36,69 (média; $dp= 1,27$) e T_m 67,64 °C (média; $dp= 1,00$), e 25 UFC de *M. synoviae*- C_q 34,09 (média; $dp= 0,22$) e T_m 72,29 °C (média; $dp= 6,02$) (Tabela 4.23).

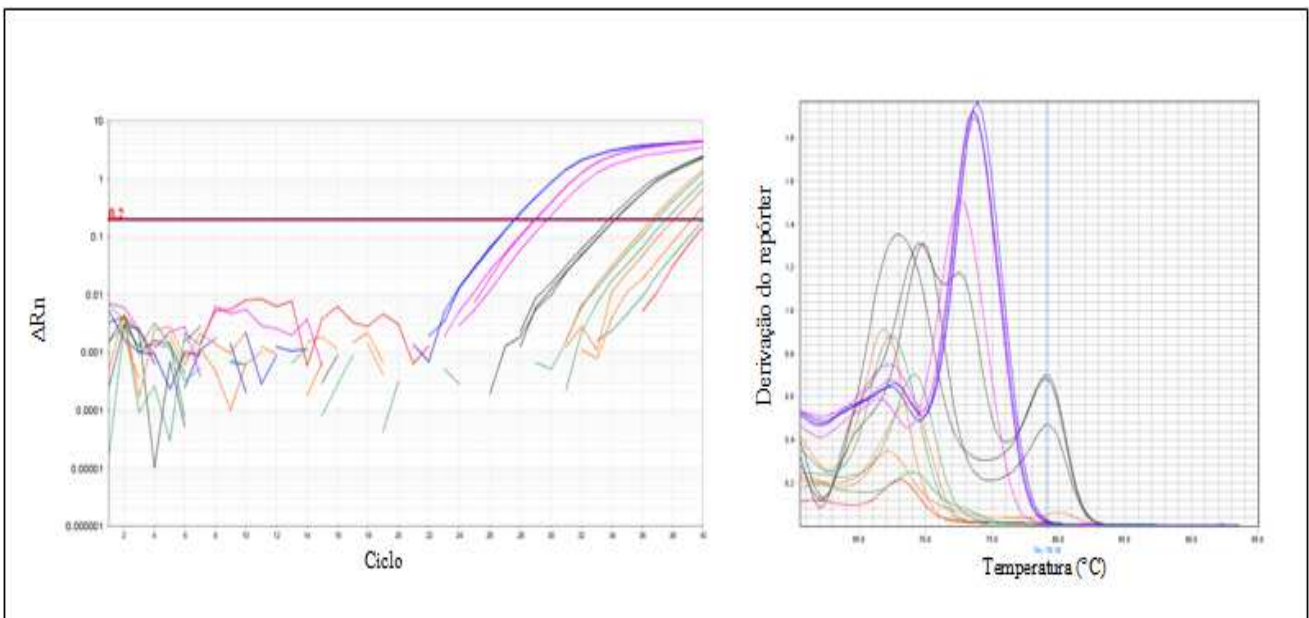


Figura 4.26: Teste de exclusividade de micoplasmas com F2R2. (Da esquerda para a direita) Gráfico de amplificação de 25 UFC de *M. pneumoniae* (em azul), pool de *M. orale*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* e *A. laidlawii* (5 UFC de cada) (em rosa) e 25 UFC de *M. orale*, *M. synoviae* e *A. laidlawii* testadas isoladamente (demais cores). Controle negativo de amplificação em vermelho.

Tabela 4.22: Percentual de similaridade entre os iniciadores do par F2R2 e outras espécies de micoplasma preconizadas pela FE 7.0 (BLASTn®-NCBI®).

Espécie de micoplasma	Similaridade			
	F2	Região	R2	Região
<i>M. orale</i>	44,4% (NR_113660)	16S rDNA	69,6% (FJ876260)	16S rDNA
<i>M. synoviae</i>	51,8% (CP011096)	Não codificante	69,6% (NR_074745)	16S rDNA
	40,7% (KJ130539)	16S rDNA		
<i>A. laidlawii</i>	48,1 % (CP000896)	Não codificante	82,6 % (NR_074448) *	16S rDNA
	33,3% (AY740437)	16S rDNA		

* As primeiras 19 bases do iniciador com 23pb pareiam com *A. laidlawii*.

Tabela 4.23: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de F2R2 com 25 UFC de *M. pneumoniae*, *M. orale*, *M. synoviae* e *A. laidlawii* testados individualmente ou em *pool*.

Microrganismo	C_q	T_m
<i>M. orale</i>	36,69	66,90
	39,22	67,24
	38,07	68,77
<i>M. synoviae</i>	33,84	67,92
	34,19	69,79
	34,24	79,16
<i>A. laidlawii</i>	37,61	69,11
	36,96	67,41
	-	68,94
<i>Pool micoplasmas</i>	29,78	72,69
	29,04	73,71
	28,99	73,54
<i>M. pneumoniae</i>	27,64	73,54
	27,70	73,88

Em relação à *A. laidlawii*, como o R2 possui similaridade de mais de 80% com a sua região 16S rDNA (BLASTn®-NCBI®), era esperado que houvesse amplificação, porém com C_q de valor elevado e pico na curva de dissociação sugestivo de amplificação específica. Entretanto, a reação de amplificação desta espécie com F2R2 obteve C_q de 37,28 (média; $dp= 0,46$) e T_m 68,49 °C (média; $dp= 0,94$) (Figura 4.24) (Tabela 4.23), demonstrando a ausência de amplificação.

Quando testado o *pool* de *M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae* e *A. laidlawii*, com 5 UFC de cada, este foi amplificado em C_q inferior ao do teste com *M. pneumoniae* isoladamente (Tabela 4.23). Dessa forma, ao contrário do que ocorreu com o par F1R1, o conjunto F2R2 obteve pior desempenho na detecção da espécie alvo (*M. pneumoniae*) quando testado em *pool*, indicando que a presença de material genético oriundo de outros micoplasmas funcionou como inibidor de reação.

4.4.2.3- Ensaios com MPF3/R3

Os iniciadores MPF3/R3, prospectados especificamente para a detecção de *M. pneumoniae*, não foram capazes de amplificar nenhuma das espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* nos ensaios por qPCR, apesar da avaliação *in silico* revelar similaridade de 100% entre *M. gallisepticum* e o iniciador anti-senso MPR3 (o que poderia gerar uma amplificação, mesmo que pouco eficiente, desta espécie) (Figura 4.27) (Tabela 4.24 e 4.25).

Tabela 4.24: Percentual de similaridade entre os iniciadores do par MPF3/R3 e outras espécies de micoplasma preconizadas pela FE 7.0 (BLASTn®-NCBI®).

Espécie de micoplasma	Similaridade			
	MPF3	Região	MPR3	Região
<i>M. orale</i>	30,4% (JQ346727)	16S rDNA	57,9% (KM507723)	16S rDNA
<i>M. synoviae</i>	47,8% (CP011096)	Endonuclease IV	57,9% (CP011096)	Proteína hipotética
	34,8% (AY768810)	16S rDNA		
<i>M. gallisepticum</i>	47,8% (CP006916)	Piruvato desidrogenase	100% (KP685379)	16S rDNA
<i>A. laidlawii</i>	60,9% (CP000896)	Redutase	52,6% (CP000896)	Proteína associada a ribossomo
	47,8% (NR_074448)	16S rDNA	42,1% (KP685382)	16S rDNA

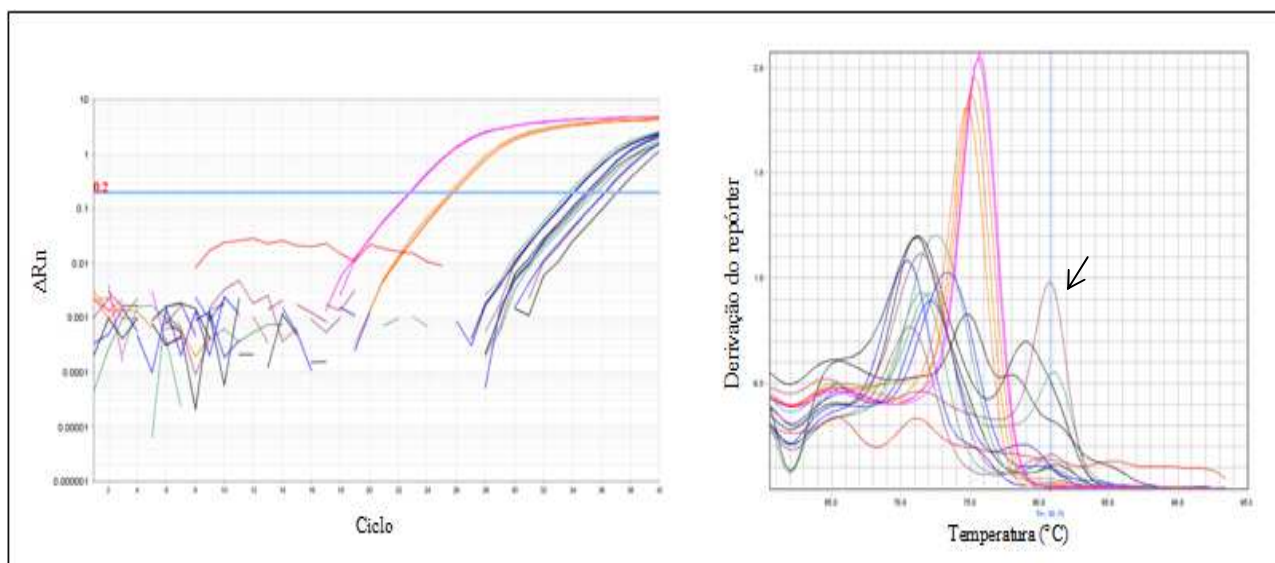


Figura 4.27: Teste de exclusividade de micoplasmas com MPF3/R3. Gráfico de amplificação de 25 UFC de *M. pneumoniae* (em rosa), pool de *M. orale*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* e *A. laidlawii* (5 UFC de cada) (em laranja) e 25 UFC de *M. orale*, *M. synoviae*, e *M. gallisepticum* e *A. laidlawii* testados isoladamente (demais cores), e suas respectivas curvas de dissociação. Controle negativo de amplificação em vermelho, e em destaque da ponta da seta, pico na curva de dissociação de *A. laidlawii* com T_m de 80,78 °C.

Tabela 4.25: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de MPF3/R3 com 25 UFC de *M. pneumoniae*, *M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *A. laidlawii* testados isoladamente e em pool.

Microrganismo	C_q	T_m
<i>M. orale</i>	34,04	70,52
	36,17	72,23
	34,96	73,42
<i>M. synoviae</i>	34,13	71,20
	37,12	74,79
	34,96	71,20
<i>M. gallisepticum</i>	33,79	72,57
	35,59	72,06
	35,29	71,54
<i>A. laidlawii</i>	35,07	70,69
	34,05	71,54
	36,28	80,78
Pool micoplasmas	25,78	74,79
	25,83	75,13
	25,57	75,30
<i>M. pneumoniae</i>	22,77	75,65
	22,88	75,65

Ainda, comparando os valores de C_q obtidos com *M. pneumoniae* e pool com as quatro espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* testadas para os outros conjuntos, foi possível observar o

aumento de cerca de 3 C_q s quando é testada a espécie específica do conjunto MPF3/R3 isoladamente (Figura 4.25). Isso pode ter ocorrido devido à menor quantidade de DNA de *M. pneumoniae* presente no *pool*, uma vez que foram adicionados 5 UFC de cada espécie de micoplasma para totalizar uma quantidade DNA referente a 25 UFC. Entretanto, como o alvo foi reduzido à quinta parte, era esperado que essa diferença fosse menor do que 3. Uma possível explicação para este fato pode ser devido à presença de outras moléculas de DNA dificultarem o pareamento dos iniciadores ao seu alvo, prejudicando assim a eficiência da reação.

4.4.2.4- Ensaios com F3R3

Por fim, nos ensaios por qPCR *in house* com os iniciadores F3R3 desenhados para *A. laidlawii* não houve detecção das espécies de *M. orale* e *M. gallisepticum*, conforme previsto nas análises *in silico* (BLASTn®- NCBI®) (Tabela 4.26). Entretanto, nos testes com as espécies *M. synoviae* e *M. pneumoniae*, as quais também não eram esperadas amplificar (Tabela 4.26), foi possível encontrar valores de C_q em 34,16 (média; dp= 0,53) e de T_m 76,72 °C (média; dp= 0,2), e de 32,98 (média; dp= 0,2) e T_m 76,66 °C (média; dp= 0,1), respectivamente (Figura 4.28) (Tabela 4.27). De forma interessante, quando analisada a reação do *pool* em relação à de *A. laidlawii* testada individualmente, foi possível observar a diferença de C_q de aproximadamente 2, a mesma encontrada nos ensaios com MPF3/R3 e F2R2, com pico único e típico de amplificação específica na mesma T_m da espécie alvo.

Tabela 4.26: Percentual de similaridade de acordo com BLASTn® (NCBI®) entre os iniciadores do par F3R3 e outras espécies de *Mycoplasma* sp. preconizadas pela FE 7.0.

Espécie de micoplasma	Similaridade			
	F3	Região	R3	Região
<i>M. orale</i>	47,4% (KM507723)	16S rDNA	38,1% (JQ346727)	16S rDNA
<i>M. synoviae</i>	57,9% (AE017245)	Não codificante	57,1% (JN247560)	Pseudogene de lipoproteína
	47,4 % (NR_074745)	16S rDNA		
<i>M. gallisepticum</i>	57,9% (CP006916)	Não codificante	52,4% (L08897)	16S rDNA
	47,4 % (NR_074433)	16S rDNA		
<i>M. pneumoniae</i>	52,6% (CP003913)	Não codificante	71,4% (CP003913)	Não codificante
	47,4% (NR_074554)	16S rDNA	38,1% (NR_074554)	16S rDNA

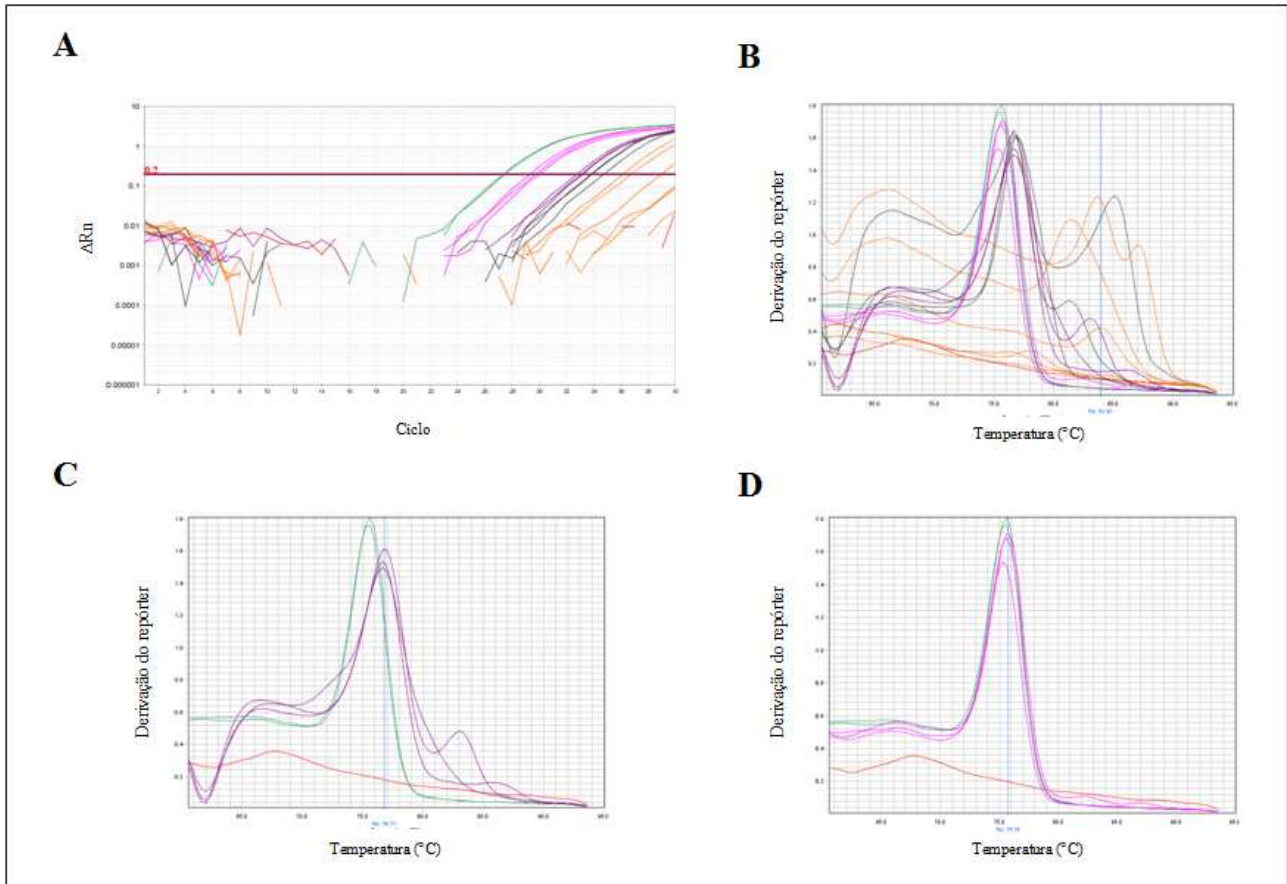


Figura 4.28: Teste de exclusividade de micoplasmas com F3R3. A e B: Gráfico de amplificação de 25 UFC de *A. laidlawii* (em verde), pool de *M. orale*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* e *A. laidlawii* (5 UFC de cada) (em rosa) e 25 UFC de *M. orale*, *M. synoviae*, *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum* testadas isoladamente (demais cores), e suas respectivas curvas de dissociação. C: Curva de dissociação de *A. laidlawii* (em verde) e de *M. pneumoniae* (em roxo). D: Curva de dissociação de *A. laidlawii* (em verde) e de pool (em rosa). Controle negativo em vermelho.

Tabela 4.27: Valores de C_q e T_m das reações de amplificação de F3R3 com 25 UFC de *A. laidlawii*, *M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae*, testados isoladamente e em pool.

Microrganismo	C_q	T_m
<i>M. orale</i>	-	61,79
	-	61,79
	-	77,97
<i>M. synoviae</i> *	33,88	76,94
	33,83	76,60
	34,76	76,60
<i>M. gallisepticum</i>	36,15	83,58
	38,93	83,93
	36,78	81,37
<i>M. pneumoniae</i> *	32,76	76,77
	33,03	76,60
	33,15	76,60
Pool micoplasmas	29,97	75,24
	29,29	75,58
	29,71	75,75
<i>A. laidlawii</i>	27,36	75,58
	27,49	75,41

* espécies pertencentes aos grupos 1 e 2P, respectivamente, que podem ser amplificadas por F3R3 com baixa sensibilidade.

Assim, além da espécie de *A. laidlawii*, o conjunto F3R3 também foi capaz de amplificar, de forma inesperada, *M. synoviae* e *M. pneumoniae*, porém com menor sensibilidade. Provavelmente, considerando um ensaio de qPCR *in house* com os iniciadores F1R1 e MPF3/R3, que são específicos para estas espécies, será possível confirmar a contaminação por estas bactérias com maior segurança.

4.5- LD da qPCR *in house*

4.5.1- Obtenção dos controles positivos

O uso de DNA plasmidial em ensaios de padronização de qPCR é rotineiramente aplicado em ensaios de quantificação absoluta para a construção da curva padrão (Pfaffl, 2004; Bustin et al., 2009; Caraguel et al., 2011; Nutz et al., 2011), pois esse material apresenta vantagens como estabilidade mesmo após longo tempo de armazenamento, capacidade de quantificação em número de cópias de DNA por volume de amostra e controle do segmento de DNA alvo, pois a clonagem é feita com o inserto que contém a região específica do material genético a ser amplificado. Essas características são aplicáveis também aos ensaios de LD, que requerem a repetibilidade dos resultados, ou seja, precisão intra-ensaios (em que a variação de valores de amostras com a mesma diluição não é significativa) (Bustin et al., 2009). Além disso, os DNAs plasmidiais são considerados amostras com elevado grau de pureza, já que não existem outras regiões de DNA que poderiam atrapalhar a eficiência da reação.

As reações de amplificação dos DNAs de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* para clonagem foram realizadas por PCR convencional utilizando os iniciadores prospectados para os ensaios de qPCR *in house* (Figura 4.29), aplicando-se os mesmos parâmetros de concentração de iniciadores e mesmo perfil de amplificação dos ensaios por qPCR. As bandas destacadas aparecem com tamanho superior ao esperado, pois a utilização de GelRed™ pode alterar o padrão de migração quando aplicado diretamente na amostra ou no gel (Unisciense[©], 2010).

Para as reações de ligação com o vetor plasmidial *pGEM*[®] *T-Easy* (Promega[©]), apenas um dos produtos de cada microrganismo, que apresentaram uma única banda com tamanho próximo ao esperado foram purificados e posteriormente quantificados por fluorimetria (Tabela 4.28).

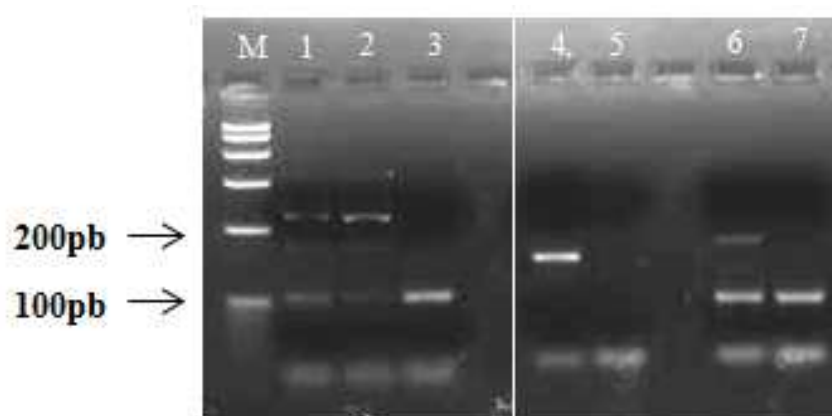


Figura 4.29: Amplificação de DNA de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* por PCR convencional utilizando os iniciadores prospectados para a qPCR *in house* (F1R1, F2R2, MPF3/R3 e F3R3). Gel de eletroforese 4% de agarose adicionado 6 μ L de GelRed™ 10000X (Uniscience®) sendo aplicado 5 μ L do produto amplificado. Legenda: 1- *M. orale*; 2- *M. synoviae*; 3- Controle negativo de amplificação do mix com F1R1; 4- *A. laidlawii*; 5- Controle negativo de amplificação do mix com F3R3; 6- *M. pneumoniae*; 7- Controle negativo de amplificação do mix com MPF3/R3.

Tabela 4.28: Quantificação após purificação dos produtos de PCR convencional selecionados para cada *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* por fluorimetria.

Microorganismo	Quantificação (η g/ μ L)
<i>M. orale</i>	7,32
<i>M. synoviae</i>	12,3
<i>M. pneumoniae</i>	4,12
<i>M. gallisepticum</i>	1,9
<i>M. fermentans</i>	4,38
<i>M. arginini</i>	6,7
<i>A. laidlawii</i>	1,9

A partir da clonagem das bactérias *E.coli* TOP10 eletrocompetentes (Life Technologies®) com os vetores plasmidiais contendo o inserto de interesse, foram selecionadas as colônias que apresentaram coloração branca após cultivo em placa com meio LB contendo X-Gal e ampicilina. As bactérias que foram transformadas com o plasmídeo adquirem o gene *LacZ*, e por isso passam a produzir a enzima β - galactosidase, que metaboliza o X-Gal em produto com pigmento de cor azul. Quando o plasmídeo sofre a reação de ligação com o inserto, esse gene é fragmentado e, assim, as bactérias que adquirirem o vetor com o inserto não conseguirão produzir a enzima e formarão colônias de coloração branca. Por fim, a presença do antibiótico no meio impede o crescimento daquelas bactérias que não sofreram a transformação, uma vez que a aquisição dos plasmídeos também confere resistência antimicrobiana (Burn, 2012).

A confirmação da clonagem foi realizada por uma PCR convencional utilizando uma alíquota da colônia recombinante ressuspensa em 20 μ L água, com fragmentos esperados de 182

pb para espécies do grupo 1, 91 pb para *M. gallisepticum*, 110 pb para *M. pneumoniae* e 189 pb para *A. laidlawii* (Figura 4.30). Em seguida, foi realizada a expansão clonal com 10µL do restante da colônia isolada, da qual foram extraídos os plasmídeos- MiniPrep. Após a quantificação por fluorimetria (Tabela 4.29), foram realizadas as reações de sequenciamento para a avaliação da orientação de inserção da sequência gênica do 16S rDNA no vetor (Figura 4.31). Em alguns casos, foi possível produzir uma maior quantidade de massa plasmidial a partir de cultivo em 100 mL e posterior extração com o kit *PureYield™ Plasmid Maxiprep System* (Promega®) - MaxiPrep.

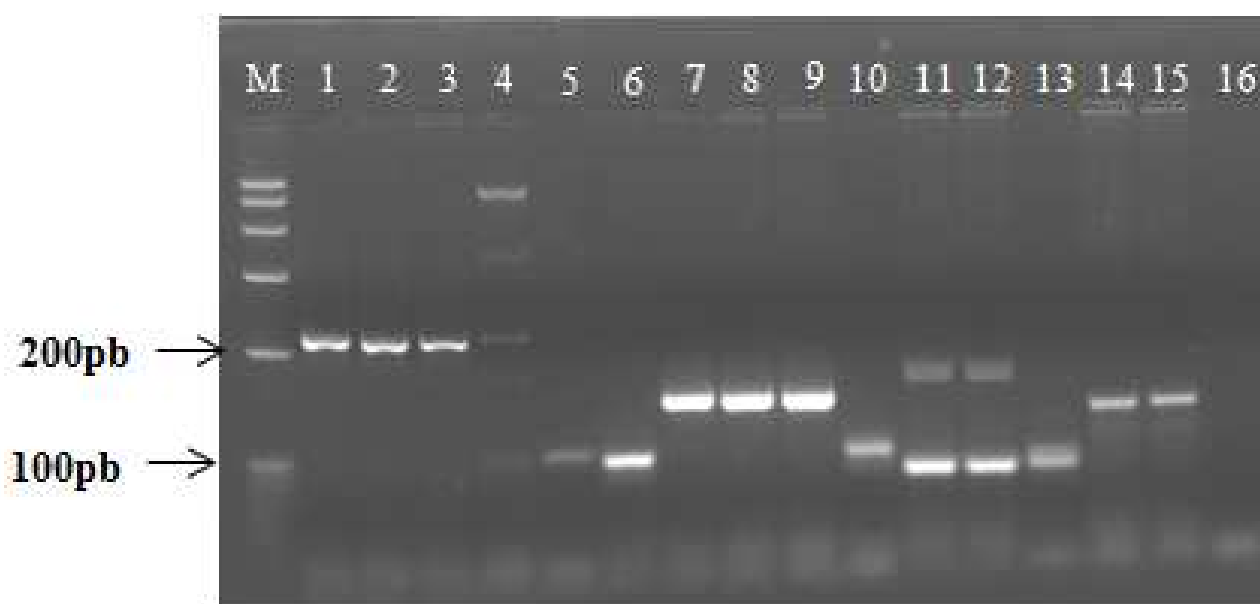


Figura 4.30: Amplificação da região 16S rDNA de algumas espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* por PCR convencional utilizando os iniciadores pertencentes ao protocolo de qPCR *in house*. Gel de eletroforese 2% agarose, com 5µL de produto aplicado, corado com 6 µL de GelRed™ 10000X (Uniscience®). Legenda: 1 a 4- *M. orale*; 5- controle negativo de PCR com os pares F1R1. 6 a 9- *M. synoviae*; 10- controle negativo de PCR com os pares F2R2; 11 e 12- *A. laidlawii*; 13- controle negativo de PCR com os pares F3R3.

Tabela 4.29: Quantificação dos plasmídeos após extração.

Microorganismo	Quantificação MiniPrep (ng/µL)	Quantificação MaxiPrep (µg/µL)*
<i>M. orale</i>	64	2,83
<i>M. synoviae</i>	81,2	1,656
<i>M. pneumoniae</i>	54,4	-
<i>M. gallisepticum</i>	92	-
<i>M. fermentans</i>	116	-
<i>M. arginini</i>	107,5	-
<i>A. laidlawii</i>	30,6	1,546

* Alguns microrganismos foram cultivados em volume de 100 mL para a obtenção de maior massa plasmidial em estoque.

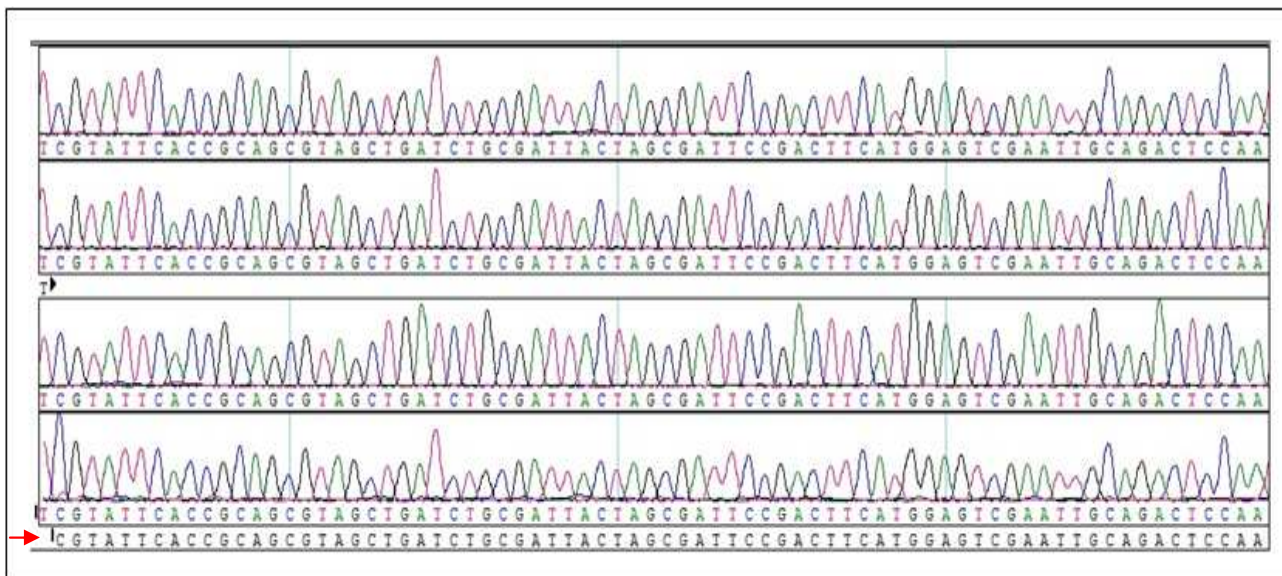


Figura 4.31: Sequenciamento do plasmídeo de *M. gallisepticum*. (De cima para baixo) Eletroferograma das fitas senso e anti-senso amplificadas com os iniciadores do vetor, e fitas senso e anti-senso amplificadas com os iniciadores F2R2. Destacado na seta em vermelho, a sequência referência da região 16S rDNA (parcial) de *M. gallisepticum*.

Após a confirmação, os ensaios de LD foram realizados a partir da construção de uma curva com oito quantidades diferentes de cópias de DNA com fator de diluição 10, em 5 replicatas, variando de 10^7 a 1 cópia. Entretanto, foi possível observar que as menores quantidades de cópias de DNA iniciais não apresentaram diferença no C_q de amplificação, demonstrando a ineficiência da reação quando o material genético foi inferior a 10^5 cópias (Figura 4.32).

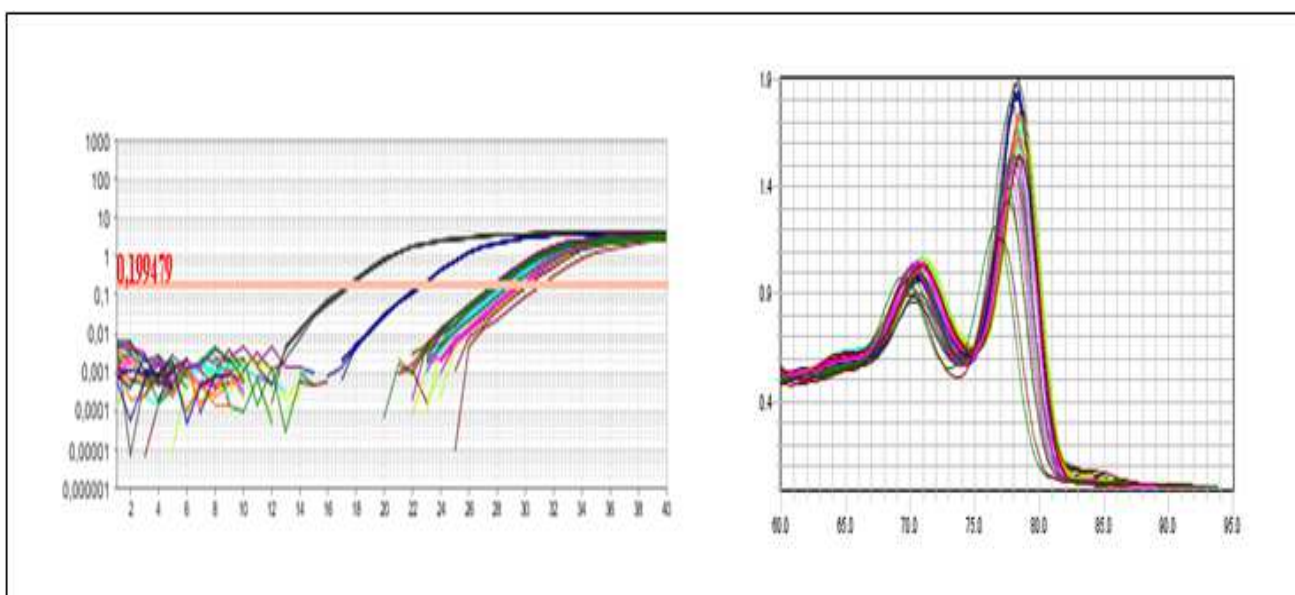


Figura 4.32: Curva de amplificação de 10^7 a 1 cópia de DNA plasmidial circular de *M. orale* por qPCR *in house* com o conjunto F1R1.

A linearização dos plasmídeos para a construção de curvas padrão é uma ferramenta geralmente utilizada, pois os linearizados oferecem valores de C_{q5} mais baixos do que os gerados pelos plasmídeos circulares. Isso é causado pela menor eficiência da reação quando os plasmídeos estão na sua forma circular nos primeiros ciclos da PCR, tornando-o pouco acessível à enzima *Taq* polimerase (Hou et al., 2010). De forma similar ao descrito na literatura, os resultados obtidos com quantidades inferiores a 10^5 cópias de plasmídeos circulares apresentam valores de C_{q5} maiores do que o esperado, demonstrando a ineficiência da reação de qPCR quando utilizando este tipo de material genético (Figura 4.32).

Portanto, para resolver os problemas encontrados anteriormente, os plasmídeos referentes a todos os micoplasmas clonados foram digeridos com a enzima de restrição *NcoI* (Promega[®]), que corta o plasmídeo em um único ponto (Figura 4.33). A confirmação da linearização foi realizada através de uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% (Figura 4.34), e para os cálculos do número de cópias de DNA / μ L necessários para os ensaios de LD, os produtos da digestão foram purificados e quantificados por fluorimetria (Tabela 4.30).

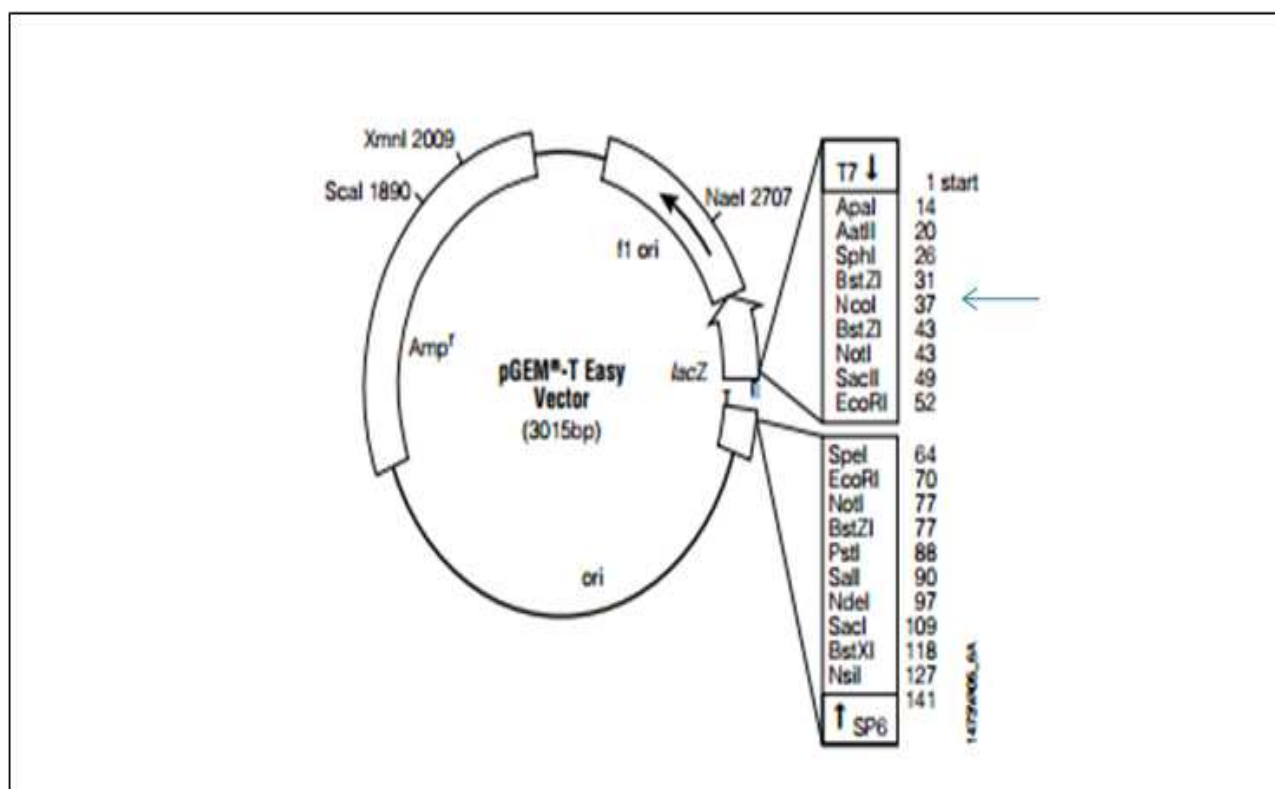


Figura 4.33: Mapa do vetor *pGEM[®] T-Easy* (Promega[®]) e os pontos de referência para corte com as enzimas listadas. Destacada na ponta da seta em azul, a enzima *NcoI* que corta em apenas um único ponto do vetor.

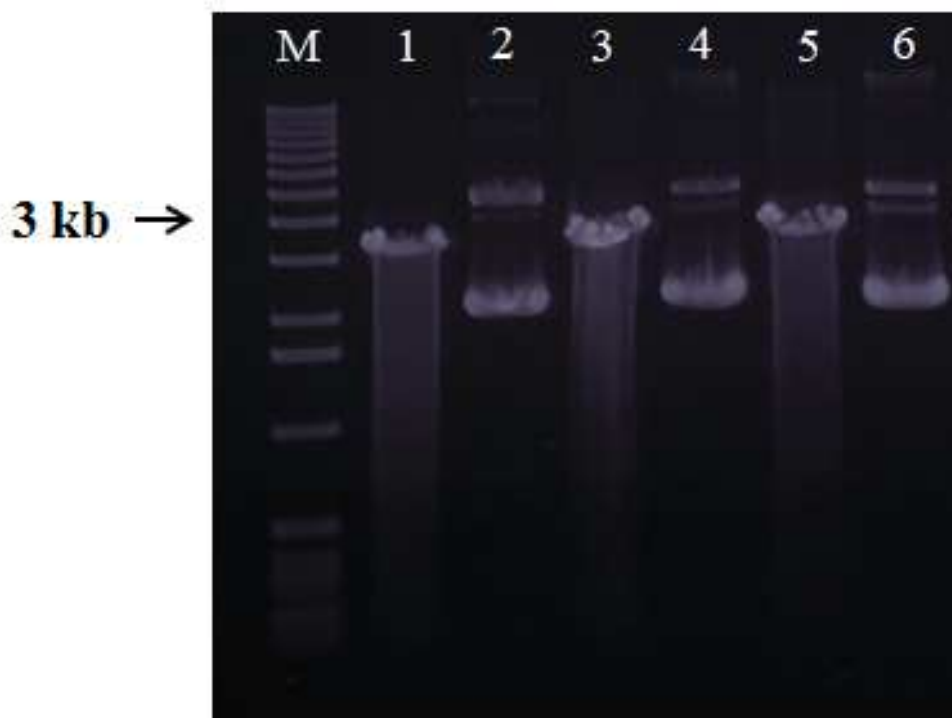


Figura 4.34: Digestão plasmidial com a enzima *NcoI* (Promega[®]). Gel de eletroforese 1% com 1 μ L de DNA plasmidial e corado com solução de GelRed[™] 3X (Uniscience[®]). Legenda: M: marcador de peso molecular; 1,3 e 5: *M. orale*, *M. synoviae* e *A. laidlawii* digeridos com *NcoI* (Promega[®]), respectivamente; 2,4 e 6: *M. orale*, *M. synoviae* e *A. laidlawii* não digeridos.

Tabela 4.30: Quantificação dos plasmídeos após digestão com a enzima *NcoI* (Promega[®]).

Microorganismo	Quantificação após digestão com <i>NcoI</i> (η g/ μ L)
<i>M. orale</i>	182,6
<i>M. synoviae</i>	276
<i>M. pneumoniae</i>	26,6
<i>M. gallisepticum</i>	11,92
<i>M. fermentans</i>	34,8
<i>M. arginini</i>	17,52
<i>A. laidlawii</i>	208

Portanto, para a determinação do LD foram construídos controles positivos linearizados a partir de clonagem de *E.coli* para a produção de DNA plasmidial específico para a região 16S

rDNA de cada *Mycoplasma* sp. e *A.laidlawii* recomendados pela FE 7.0, exceto *M. hyorhinitis* que, devido ao seu difícil cultivo (Rawadi & Dussurget, 1995), não havia sido cultivado a tempo pelo SEPIN para a obtenção de material para a extração de DNA.

4.5.2- Ensaios de LD

A estimativa do LD pode ser feita experimentalmente a partir de uma curva padrão com diluições seriadas do alvo para a determinação do ponto de corte positivo (também conhecido como *cut-off* positivo), em que a menor concentração deverá ser detectada em pelo menos 95% dos testes (Caraguel et al., 2011; Farmacopeia Europeia, 2010). Além disso, foi observada a linearidade da curva, pois ela demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração de DNA na amostra, dentro de um intervalo especificado (Brasil, 2003a).

4.5.2.1- Ensaios com os iniciadores do grupo 1, 2M, 2P e 3

De acordo com Pfaff (2004), quando testadas quantidades muito pequenas de cópias de DNA- abaixo de 20 por reação- a variação entre as replicatas se torna significativa. Apesar de ter ocorrido amplificação de 1 cópia de DNA nas cinco replicatas de *M. synoviae* e *M. orale*, e em três replicatas de *M. fermentans* e *M. arginini*, não há diferença significativa do valor de C_q entre essa quantidade e 10 cópias de DNA, demonstrando a acurácia dos ensaios apenas até este valor. Como o ensaio de qPCR *in house* com F1R1 não conseguiu distinguir a amplificação de 10 e 1 cópia por análise de C_q , o LD estabelecido para estes oligonucleotídeos foi de 10 cópias. De acordo com a tabela 4.31, é possível observar que a T_m entre as diferentes espécies do grupo 1 variam de cerca 2,5°C.

Os ensaios com o par F2R2, desenhado para a detecção de *M. gallisepticum*, demonstraram que o LD para esta espécie é de 10 cópias de DNA, em C_q de 31,18 (média; dp= 1,18), com T_m específica do fragmento alvo de 75,87 (média; dp= 0,22). De forma semelhante, os iniciadores MPF3/R3 também foram capazes de detectar pelo menos 10 cópias de DNA de *M. pneumoniae* em C_q foi de 29,94 (média; dp= 1,81) e T_m 75,83 °C (média; dp= 0,14). Ambos os conjuntos de iniciadores amplificam suas espécies alvo com T_m de aproximadamente 75 °C.

Já nos ensaios com os iniciadores F3R3, que amplificam *A. laidlawii*, foi possível detectar 1 cópia de DNA com acurácia em C_q 35,14 (média; dp= 0,42), e T_m de 75,21 °C (média; dp= 0,38). De forma interessante, foi possível observar pela análise da curva de dissociação em todos os

ensaios das figuras 4.35 e 4.36 que, conforme há o aumento da diluição de DNA, maior a probabilidade de ocorrência de picos sugestivos de dímeros de iniciador e menor é o valor de ΔR_n do pico específico da espécie de *Mycoplasma* sp. testada. Esses fenômenos ocorrem devido à baixa quantidade de DNA alvo na reação, propiciando assim a maior interação entre os iniciadores para a formação de dímeros. Além disso, como a amostra diluída forma menor quantidade de produto específico, menor é a quantidade de moléculas de SYBR[®] Green ligada ao produto e, conseqüentemente, menor é a intensidade de fluorescência gerada (Life Technologies, 2012).

Portanto, o LD da qPCR *in house* para a detecção de *Mycoplasma* sp. é de 10 cópias de DNA (exceto *A. laidlawii*- 1 cópia), com *cut-off* em relação ao C_q de 32 (média, dp= 2,22) para o par F1R1, de 31,18 (média; dp= 1,18) para o par F2R2, de 29,94 (média; dp= 1,81) para o par MP F3/R3 e de 35,14 (média; dp= 0,42) para os iniciadores F3R3. Vale ressaltar que, em ensaios com o sistema de detecção de SYBR[®] Green requerem a análise não só do C_q de amplificação da amostra, mas também a avaliação da curva de dissociação do fragmento gerado (Life Technologies, 2012). Dessa forma, amostras que amplifiquem com valores de C_q acima do limite estabelecido, mas que apresentem picos com T_m próximas aos das espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* devem ser reavaliadas para a confirmação de presença ou ausência dessas bactérias.

Tabela 4.31: Valores da T_m calculados por microrganismo.

Grupo	Espécie	Valor de T_m (média)
1	<i>M. fermentans</i>	78,39
	<i>M. orale</i>	77,83
	<i>M. synoviae</i>	76,11
	<i>M. arginini</i>	78,08
2M	<i>M. gallisepticum</i>	75,87
2P	<i>M. pneumoniae</i>	75,65
3	<i>A. laidlawii</i>	75,21

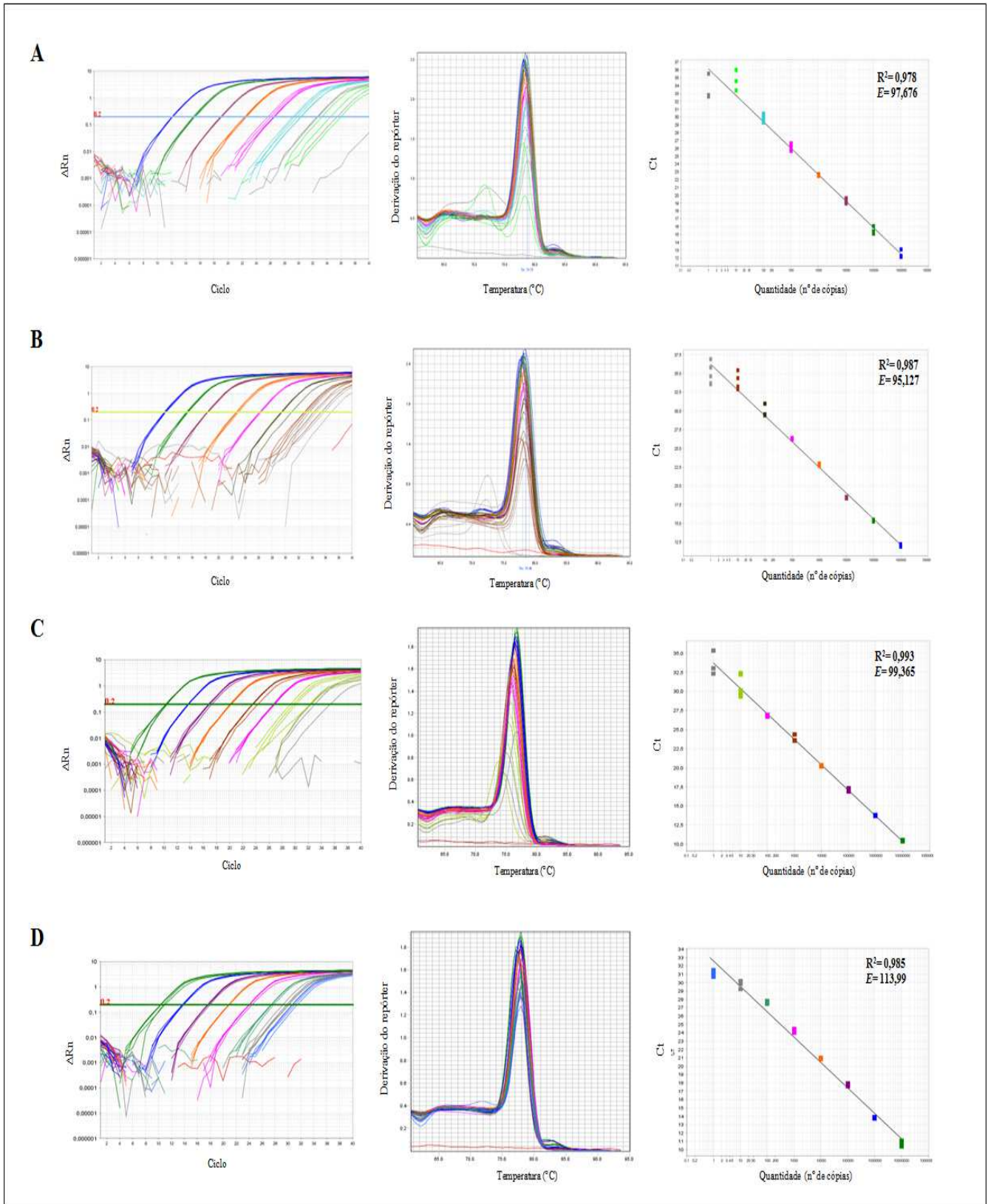


Figura 4.35: Ensaio de LD por qPCR *in house* com os iniciadores do grupo 1. A-D: Amplificação de 10⁷ a 1 cópia de DNA de *M. fermentans*, *M. arginini*, *M. synoviae* e *M. orale* (controle negativo de amplificação em vermelho). Legenda: R²: coeficiente de correlação; E: eficiência da reação.

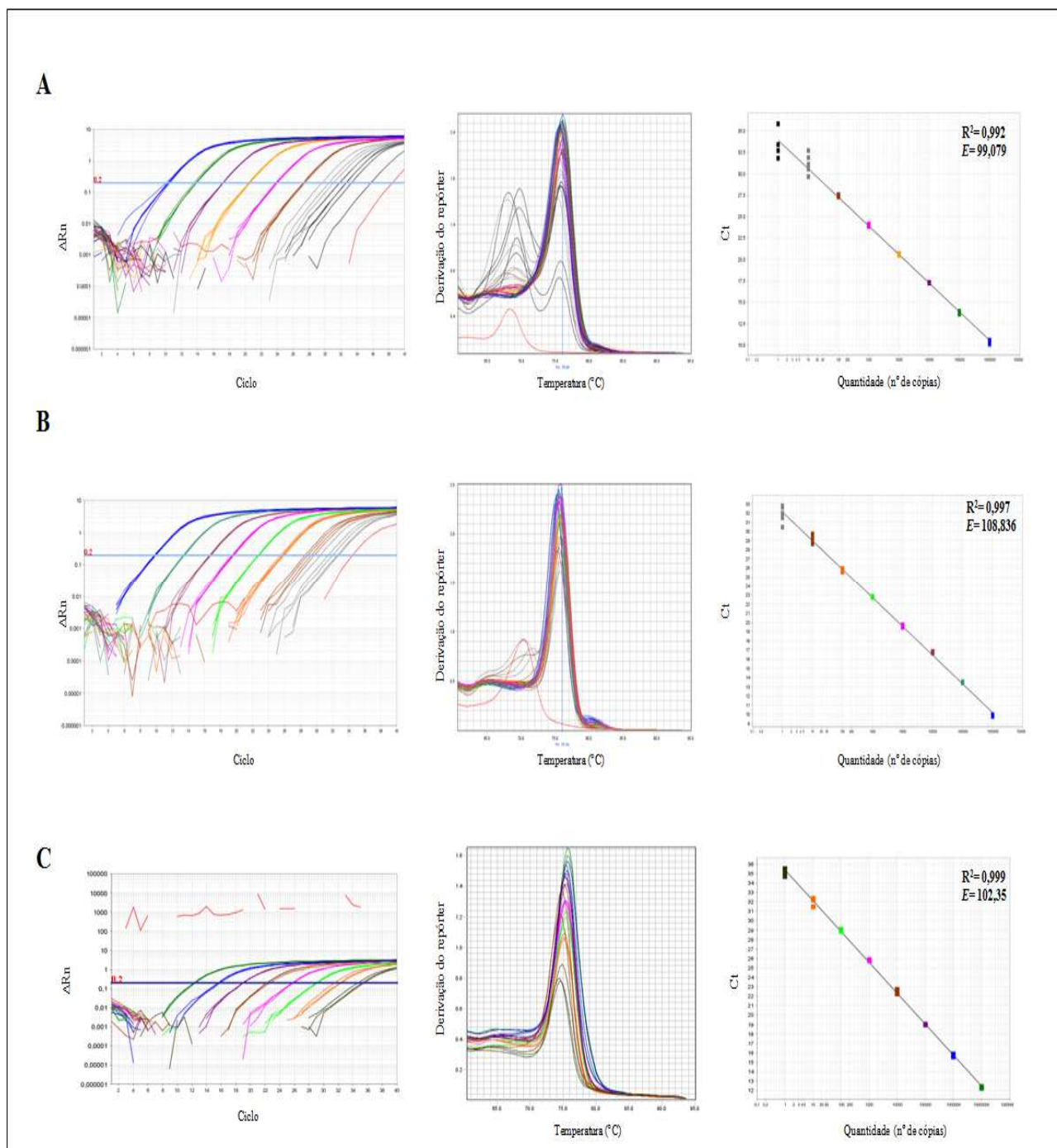


Figura 4.36: Ensaio de LD por qPCR *in house* com os iniciadores do grupo 2, 3 e 4. A: Amplificação de 10^7 a 1 cópia de DNA de *M. gallisepticum* com os iniciadores F2R2. **B:** Amplificação de 10^7 a 1 cópia de DNA de *M. pneumoniae* com os iniciadores MPF3/R3 e **C:** Amplificação de 10^7 a 1 cópia de DNA de *A. laidlawii* com os iniciadores F3R3 (controle negativo de amplificação em vermelho). Legenda: R^2 : coeficiente de correlação; E : eficiência da reação.

4.5.2.2- Considerações acerca do LD

Para os testes de controle de qualidade microbiológica em indústrias, são críticos os casos de resultado falso-negativos, uma vez que a utilização de produtos farmacêuticos contaminados

apresentam riscos para o usuário. Portanto, apesar de ter sido estabelecido um valor de *cut-off* referente ao C_q de amplificação, os casos em que for detectado sinal fluorescente em valores de C_q acima do limite, associado a fragmento com T_m específico do alvo, devem ser reavaliados novamente por qPCR, e em último caso, sequenciados para a confirmação da contaminação. Esta reavaliação da amostra aumenta a segurança dos produtos produzidos por Bio-Manguinhos e assegurados pelo controle de qualidade microbiológico.

Ainda, vale ressaltar que há uma forte tendência para a modificação dos critérios para o estabelecimento do *cut-off*, uma vez que o valor de corte exato que corresponda a pelo menos 95% das amostras positivas é difícil de ser estimado. Agências reguladoras como a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) adotaram como 50% o percentual de amostras positivas necessárias para o estabelecimento do *cut-off* em reações de PCR (Burns & Valdivia, 2008; Caranguel et al., 2011). Portanto, essa medida poderia ser adotada em outros setores da saúde de forma a aumentar a precisão do limite de detecção e reduzir os casos de falso-negativos.

4.6- Comparação do desempenho da qPCR *in house* com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) e a PCR convencional multiplex

4.6.1- Ensaio *in vitro* da detecção de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii*

Na literatura existem diversos trabalhos acerca da detecção de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii* por PCR convencional, inclusive utilizando *nested*- PCR para o aumento da sensibilidade da técnica. Nestes casos, a amplificação do alvo ocorre em duas etapas: a primeira com um conjunto de iniciadores que farão uma pré-seleção do fragmento alvo, e a segunda, que a partir do produto da primeira etapa, amplifica o fragmento específico com o uso de iniciadores direcionados para uma região mais interna do produto. O acréscimo desta segunda etapa de amplificação aumenta a sensibilidade de uma PCR convencional porém, as desvantagens como a demora e o risco para o manipulador durante a revelação dos resultados ainda é acrescida com o elevado risco de contaminação cruzada das amostras proporcionada pela manipulação de produto amplificado da primeira para a segunda etapa (Spaepen et al., 1992; Hopert et al., 1993; Rawadi & Dussurge, 1995; Mendong et al., 1995). Dessa forma, o uso de técnicas biomoleculares mais avançadas se faz necessário, principalmente no ambiente industrial, no intuito de atender às exigências dos órgãos reguladores como ANVISA e OMS (Raymaekers et al., 2009).

De forma a comparar o desempenho da qPCR *in house* com a PCR convencional multiplex atualmente realizada na SETBI, foi extraído DNA de 4 espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, nas quantidades correspondentes a 50 (exceto *M. orale* e *M. synoviae*- 25 UFC), 10, 2 e 0,4 UFC. Além disso, o mesmo material genético foi também amplificado por qPCR utilizando o kit comercial *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) e os resultados comparados quanto ao C_q de cada uma das concentrações, à linearidade dos ensaios e à eficiência da reação.

De acordo com a figura 37 (A e B) e a tabela 4.32, tanto a qPCR *in house* quanto o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) foram capazes de amplificar até 0,4 UFC de *M. orale* sem diferença de C_q significativa ($p= 0,99$), demonstrando a equivalência dos dois protocolos de amplificação por qPCR.

Em relação à PCR convencional, apesar de ser possível visualizar nas três replicatas de 0,4 UFC, estas são de fraca intensidade, sugerindo que o teste nessas quantidades não possui reprodutibilidade, podendo em ensaios subsequentes não serem detectadas. Portanto, pode-se afirmar que este método foi capaz de detectar com segurança apenas 2 UFC (Figura 4.37 C).

Tabela 4.32: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de *M. orale* por qPCR com o protocolo *in house* e com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]).

Quantidade de <i>M. orale</i>	qPCR <i>in house</i>		qPCR <i>MycoSEQ</i> [®]	
	C_q	T_m	C_q	T_m
25 UFC	24,93	77,14	26,25	79,22
	24,86	77,48	26,52	78,87
	24,81	77,66	26,35	79,05
10 UFC	26,31	77,66	27,19	79,39
	25,84	77,83	27,27	79,05
	26,00	77,83	27,25	79,05
2 UFC	29,14	77,31	29,72	79,39
	28,69	77,66	29,70	78,87
	29,13	77,66	30,07	78,87
0,4 UFC	31,40	77,31	30,85	78,70
	30,34	77,31	32,98	78,70
	30,44	77,31	31,34	78,70

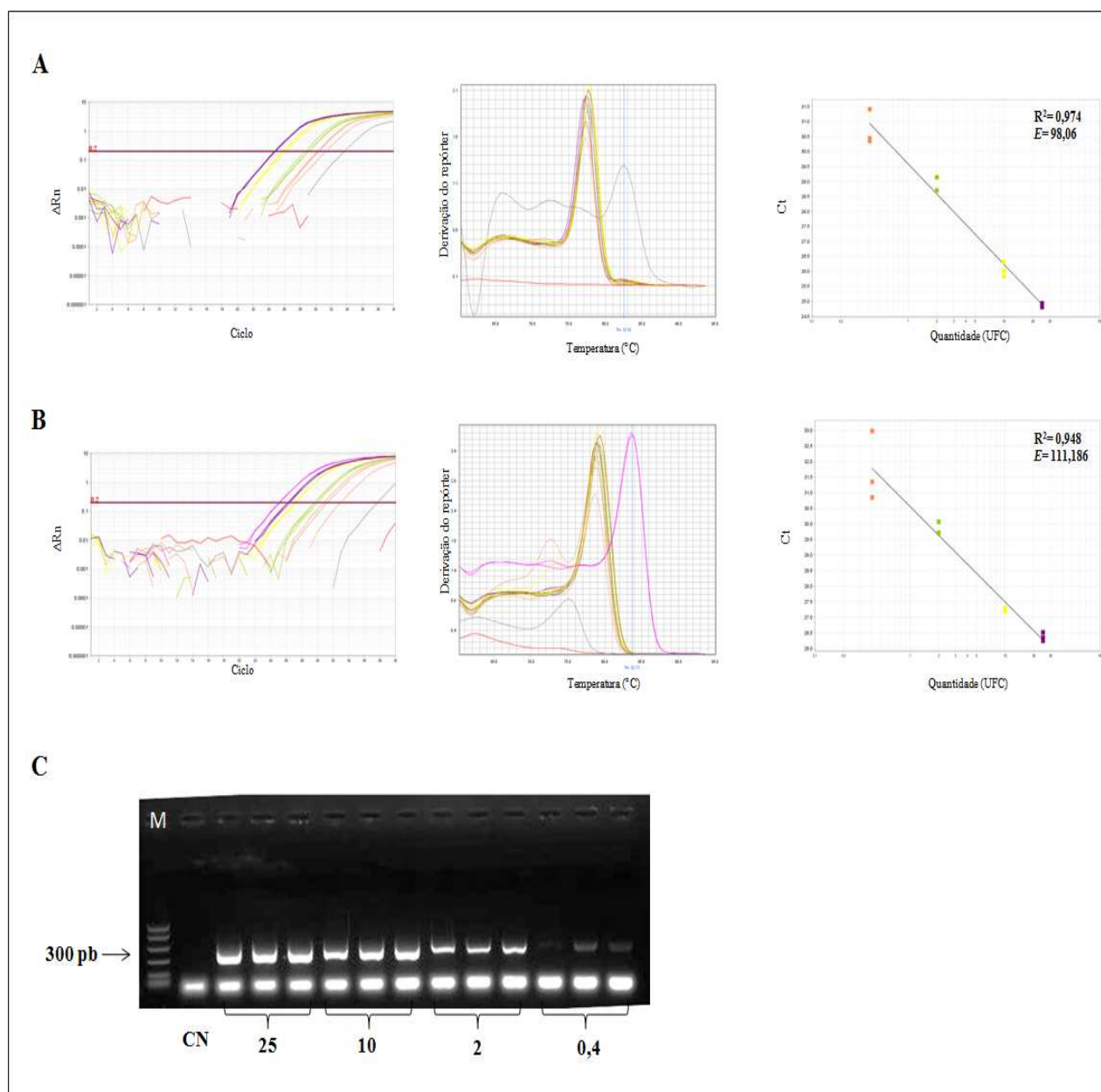


Figura 4.37: Comparação do desempenho da qPCR *in house* na detecção de *M. orale* com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) e PCR multiplex convencional. **A e B:** Amplificação de 25 (em roxo), 10 (em amarelo), 2 (em verde) e 0,4 UFC (em laranja) de *M. orale* por qPCR com protocolo *in house* e kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]), respectivamente. Controle negativo de extração em cinza, controle negativo de qPCR em vermelho e CPD- controle positivo do *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) em rosa. **C:** Amplificação de 25, 10, 2 e 0,4 UFC de *M. orale* por PCR convencional multiplex. Legenda: M: marcador de peso molecular de 100 pb; CN: controle negativo de amplificação.

Assim como nos ensaios com *M. orale*, a detecção de até 0,4 UFC de *M. synoviae* também foi possível através da qPCR *in house* e o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) não havendo diferença entre os protocolos ($p=0,76$) (Figura 38 A e B) (Tabela 4.33).

Através da PCR convencional, também foi possível a detecção de 0,4 UFC de *M. synoviae* (Figura 4.38 C). A diferença na intensidade das bandas da PCR convencional com esta espécie, quando comparado com os resultados obtidos anteriormente com *M. orale*, não pode ser explicado

pois ambos os microrganismos são amplificados pelos mesmos iniciadores (um senso e dois anti-sensos), os quais possuem similaridade com a região 16S rDNA de 95 a 100% (KM507723 e NR_113660- *M. orale*) (AM073015 e KJ130539- *M. synoviae*). Vale ressaltar que a qualidade do DNA de *M. orale* poderia ter interferido na amplificação por PCR convencional, mas isso não pode ser avaliado por espectrofotometria com NanoDrop (ThermoFisher®) devido ao precário desempenho deste equipamento em avaliar quantidades muito baixas de DNA (dados não mostrados), como o esperado em menos de 1 UFC de bactéria.

Adicionalmente à PCR convencional, também foi observada uma diferença de aproximadamente 3 C_qs entre 25 UFC de *M. orale* e a mesma quantidade de *M. synoviae* por qPCR (*in house* e com o kit comercial). Entretanto, mesmo supondo certo grau de degradação do DNA da amostra, isto não interferiu nos resultados por qPCR pelos dois protocolos.

Tabela 4.33: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de *M. synoviae* por qPCR com o protocolo *in house* e com o kit MycoSEQ® (Life Technologies®).

Quantidade de <i>M. synoviae</i>	qPCR <i>in house</i>		qPCR MycoSEQ®	
	C _q	T _m	C _q	T _m
25 UFC	20,74	75,23	20,92	79,39
	20,52	75,75	20,65	78,35
	20,63	75,75	20,57	78,53
10 UFC	21,72	75,92	21,94	79,05
	21,72	76,10	21,94	78,70
	21,82	75,92	21,90	78,87
2 UFC	24,32	75,57	24,62	79,22
	24,06	75,75	24,55	78,53
	24,11	75,57	24,51	78,53
0,4 UFC	27,41	74,88	27,09	79,22
	26,87	75,57	27,08	78,18
	26,87	75,57	27,12	78,18

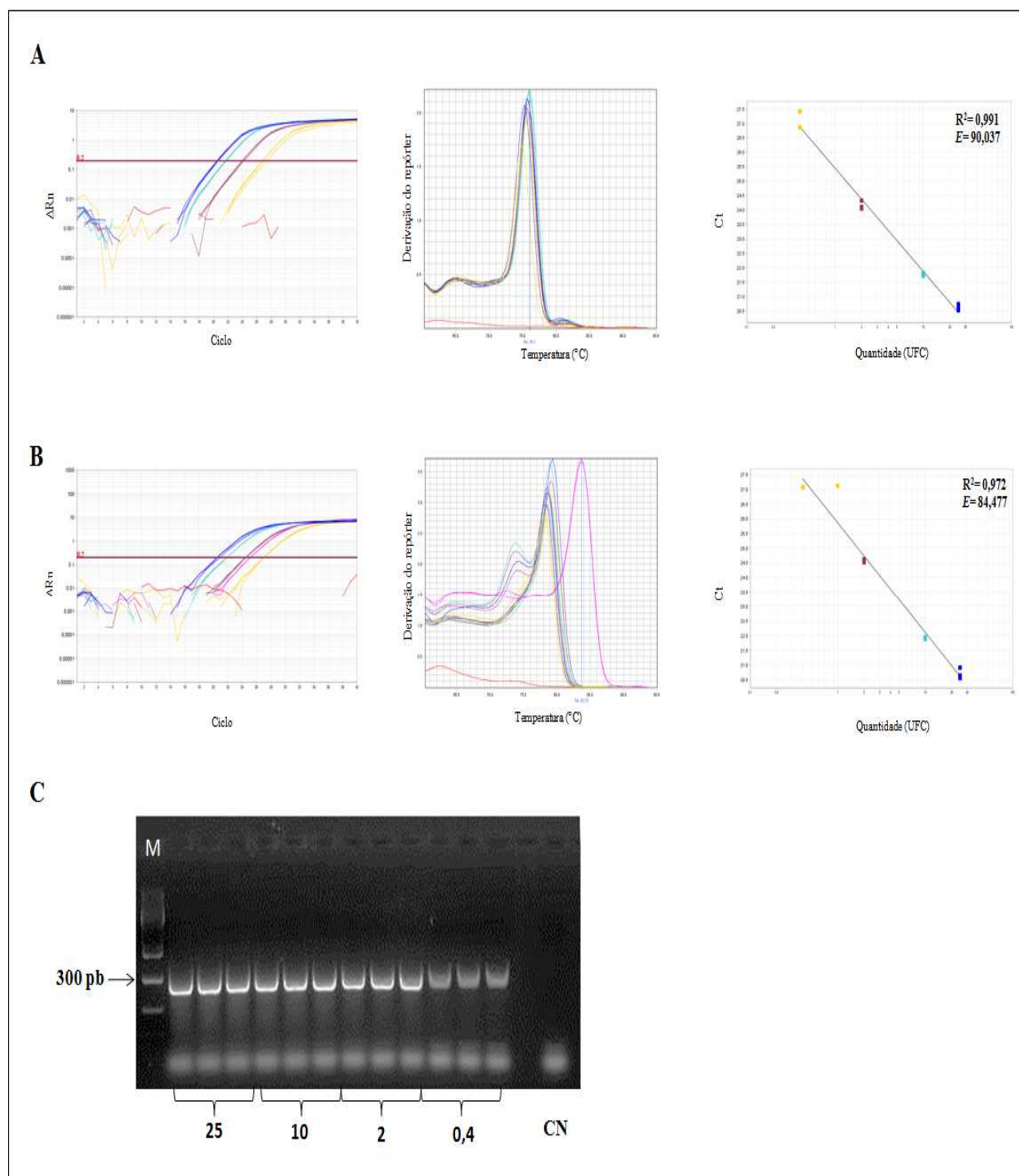


Figura 4.38: Comparação do desempenho da qPCR *in house* na detecção de *M. synoviae* com o kit *MycoSEQ*® (Life Technologies®) e PCR multiplex convencional. **A e B:** Amplificação de 25 (em azul escuro), 10 (em azul claro), 2 (em marrom) e 0,4 UFC de *M. synoviae* por qPCR com protocolo *in house* e kit *MycoSEQ*® (Life Technologies®), respectivamente. Controle negativo de extração em cinza, controle negativo de qPCR em vermelho e CPDE- controle positivo do *MycoSEQ*® (Life Technologies®) em rosa. **C:** Amplificação de 25, 10, 2 e 0,4 UFC de *M. synoviae* por PCR convencional multiplex. Legenda: M: marcador de peso molecular de 100 pb; CN: controle negativo de amplificação.

Apesar da quantidade de SYBR[®] Green presente no mix das reações do *Mycoseq*[®] (Life Technologies[®]) ser 25% maior do que o da qPCR com protocolo *in house* (Tabelas 3.3 e 3.4), a amplificação de *M. gallisepticum* não apresentou diferença quanto aos valores de C_q obtidos em todas as quantidades de UFC testadas ($p= 0,85$) pela qPCR *in house* (Figura 4.39 A e B). Entretanto, analisando a curva de dissociação, conforme houve a diminuição da quantidade de UFC, maior a formação de picos secundários sugestivos de dímero de iniciadores - T_m inferior a 70 °C. Esse fenômeno, já visto anteriormente em 4.5.2.1, não ocorreu nas reações com o kit comercial, porém este só foi capaz de detectar 0,4 UFC em apenas uma das triplicatas (Figura 4.39 B) (Tabela 4.34). Para solucionar o fenômeno visto nas reações de qPCR *in house*, poderia ser reavaliada a quantidade de SYBR[®] Green, ou até mesmo o aprimoramento do ensaio através de sondas de hidrólise.

Avaliando *in silico* os iniciadores utilizados pela PCR convencional (Uphoff & Drexler, 2002), seis seriam capazes de amplificar *M. gallisepticum* (cinco sensores e um anti-sensores), pois possuem similaridade com a região 16S rDNA variando de 90 a 100% (KC995374). Entretanto, foi possível detectar com segurança apenas 10 UFC de *M. gallisepticum*, demonstrando a superioridade da qPCR *in house* na detecção desta espécie (Figura 4.39 C).

Tabela 4.34: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de *M. gallisepticum* por qPCR com o protocolo *in house* e com o kit *Mycoseq*[®] (Life Technologies[®]).

Quantidade de <i>M.gallisepticum</i>	qPCR <i>in house</i>		qPCR <i>Mycoseq</i> [®]	
	C_q	T_m	C_q	T_m
50 UFC	27,19	75,60	27,96	79,52
	27,33	75,94	28,07	79,69
	27,29	75,94	27,82	79,69
10 UFC	30,16	75,26	30,82	79,52
	29,67	75,43	30,18	79,52
	29,85	75,26	30,61	79,52
2 UFC	37,10 *	68,27	32,66	79,52
	32,14	75,09	33,08	79,52
	31,11	75,09	34,18	79,52
0,4 UFC	34,86 *	66,05	-	72,87
	34,34	74,75	34,99	79,01
	35,31 *	67,25	-	71,85

* através da curva de dissociação pode-se afirmar que não houve amplificação.

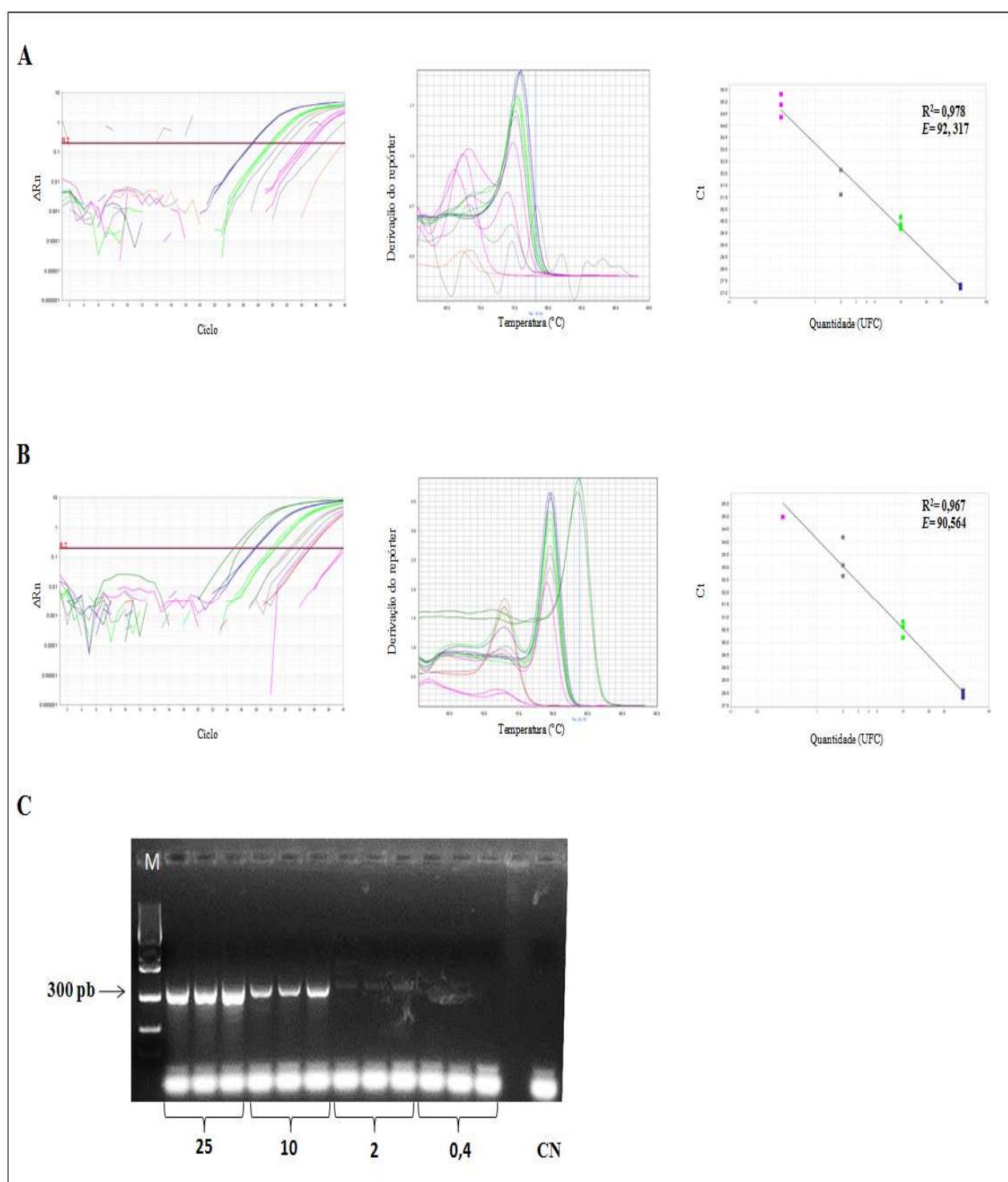


Figura 4.39: Comparação do desempenho da qPCR *in house* na detecção de *M. gallisepticum* com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) e PCR multiplex convencional. **A e B:** Amplificação de 25 (em azul), 10 (em verde claro), 2 (em cinza) e 0,4 UFC (em rosa) de *M. gallisepticum* por qPCR com protocolo *in house* e kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]), respectivamente. Controle negativo de extração em cinza, controle negativo de qPCR em vermelho e CPDE- controle positivo do *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) em verde escuro **C:** Amplificação de 25, 10, 2 e 0,4 UFC de *M. gallisepticum* por PCR convencional multiplex. Legenda: M: marcador de peso molecular de 100 pb; CN: controle negativo de amplificação.

Os ensaios com *M. pneumoniae* por qPCR com os oligonucleotídeos MPF3/R3 também mostrou igual desempenho em comparação com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) ($p= 0,85$) (Figura 4.40 A e B) (Tabela 4.35).

Em relação à PCR convencional (Uphoff & Drexler, 2002), sete iniciadores amplificam esta espécie (5 senso e 2 anti-sensos) possuindo similaridade de 90 a 100% com 16S rDNA (NR_074554). Contrariamente à espécie de *M. gallisepticum*, que é amplificada pelos mesmos iniciadores que *M. pneumoniae* (exceto por um iniciador anti-senso), todas as quantidades de UFC foram detectadas por esta técnica, demonstrando não haver diferença entre a qPCR e a PCR convencional para esta espécie (Figura 4.40 C).

Tabela 4.35: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de *M. pneumoniae* por qPCR com o protocolo *in house* e com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]).

Quantidade de <i>M.pneumoniae</i>	qPCR <i>in house</i>		qPCR <i>MycoSEQ</i> [®]	
	C_q	T_m	C_q	T_m
50 UFC	22,74	.*	23,31	78,08
	22,15	75,88	23,40	78,25
	22,11	76,05	23,56	78,42
10 UFC	25,35	74,67	25,63	78,08
	24,90	75,36	25,72	78,08
	24,77	75,54	25,63	78,08
2 UFC	27,53	75,02	28,34	78,08
	27,22	75,36	28,35	78,08
	27,36	75,36	28,29	78,08
0,4 UFC	30,33	74,85	30,89	77,91
	29,66	74,85	30,61	77,74
	30,27	75,02	30,82	77,91

* O valor de T_m não pode ser estabelecido devido à um erro no *software* especificamente no poço dessa reação.

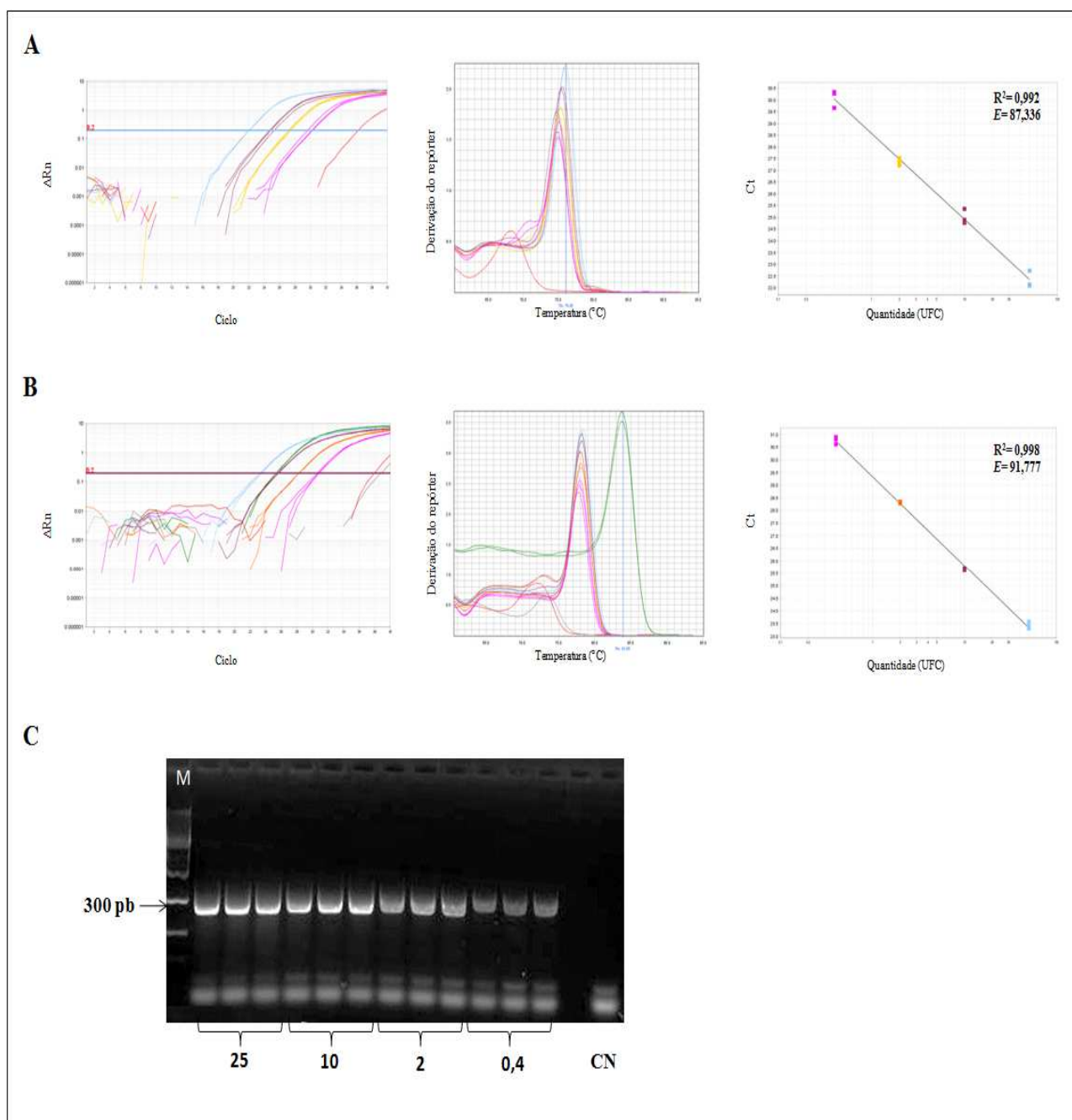


Figura 4.40: Comparação do desempenho da qPCR *in house* na detecção de *M. pneumoniae* com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) e PCR multiplex convencional. A e B: Amplificação de 25 (em azul), 10 (em verde claro), 2 (em cinza) e 0,4 UFC (em rosa) de *M. pneumoniae* por qPCR com protocolo *in house* e kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]), respectivamente. Controle negativo de extração em cinza, controle negativo de qPCR em vermelho e CPDE- controle positivo do *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) em verde escuro C: Amplificação de 25, 10, 2 e 0,4 UFC de *M. pneumoniae* por PCR convencional multiplex. Legenda: M: marcador de peso molecular de 100 pb; CN: controle negativo de amplificação.

Por último, foi testada a amplificação de *A. laidlawii* pelas três metodologias, nas quantidades de 50, 10, 2 e 0,4 UFC. O protocolo de qPCR *in house* e o kit comercial da Life Technologies apresentaram desempenhos equivalentes na detecção desta espécie ($p=0,99$) (Figura 4.41 A e B) (Tabela 4.36).

Contrariamente às espécies de *M. gallisepticum* e *M. pneumoniae*, apenas quatro iniciadores (dois senso e dois anti-senso) são capazes de detectar *A. laidlawii*, possuindo similaridade com o locus 16S rDNA de 80 a 100%. Apesar da presença de dois conjuntos de iniciadores na reação, a detecção das mesmas quantidades de DNA por PCR convencional foi possível apenas até 10 UFC. A presença das bandas de 2 UFC e 0,4 UFC de fraca intensidade sugerem que o teste nessas quantidades não possuem reprodutibilidade, podendo em ensaios subsequentes não serem detectadas (Figura 4.41 C).

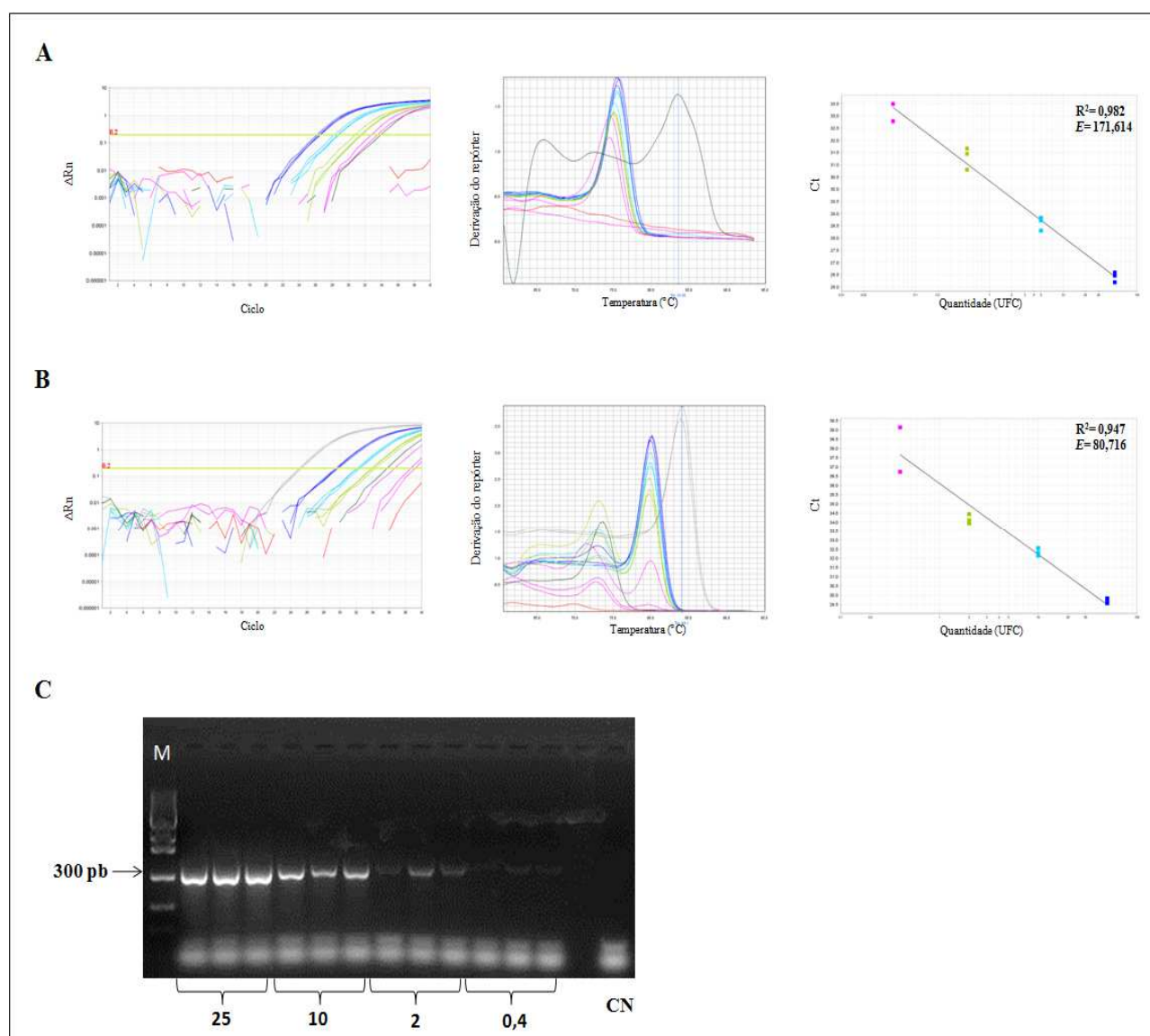


Figura 4.41: Comparação do desempenho da qPCR *in house* na detecção de *A. laidlawii* com o kit MycoSEQ® (Life Technologies®) e PCR multiplex convencional. A e B: Amplificação de 25 (em azul escuro), 10 (em azul claro), 2 (em verde) e 0,4 UFC (em rosa) de *A. laidlawii* por qPCR com protocolo *in house* e kit MycoSEQ® (Life Technologies®), respectivamente. Controle negativo de extração em cinza (gráfico A), controle negativo de qPCR em vermelho e CPD- controle positivo do MycoSEQ® (Life Technologies®) em cinza (gráfico B). **C:** Amplificação de 25, 10, 2 e 0,4 UFC de *A. laidlawii* por PCR convencional multiplex. Legenda: M: marcador de peso molecular de 100 pb; CN: controle negativo de amplificação.

Tabela 4.36: Valores de C_q e T_m obtidos da amplificação de *A. laidlawii* por qPCR com o protocolo *in house* e com o kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]).

Quantidade de <i>A. laidlawii</i>	qPCR <i>in house</i>		qPCR <i>MycoSEQ</i> [®]	
	C_q	T_m	C_q	T_m
50 UFC	26,20	75,52	29,84	80,15
	26,59	75,52	29,57	79,98
	26,46	75,69	29,67	79,98
10 UFC	28,83	75,18	32,32	79,98
	28,71	75,52	32,55	79,98
	28,30	75,52	32,15	79,98
2 UFC	30,80	75,01	34,10	79,81
	31,66	75,18	34,45	79,81
	31,44	75,01	33,93	79,81
0,4 UFC	33,48	74,49	36,73	79,98
	-	61,80	39,14	72,78
	32,79	74,49	38,58	72,95

Em relação à qPCR, não houve diferença entre os dois protocolos na capacidade de detecção das 4 espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, inclusive na menor concentração de 0,4 UFC, mesmo a quantidade de SYBR[®] Green da qPCR *in house* ser inferior ao kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]). Dessa forma, foi possível sugerir que as reações *in house* são equivalentes às do kit comercial.

Além disso, em contraste com a PCR convencional, a metodologia de qPCR permite a detecção de ácidos nucleicos de forma mais rápida e sensível, revolucionando a área da biologia molecular aplicada não só à pesquisa, mas também ao diagnóstico laboratorial e à área industrial farmacêutica (Csako, 2006; Lind et al., 2006). Corroborando com a literatura, qPCR *in house* mostrou melhor desempenho quando comparado com o protocolo de PCR multiplex convencional pois foi capaz de detectar 0,4 UFC das 4 espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* testadas.

4.6.2- Outras vantagens da qPCR *in house*

Além da qPCR *in house* possuir maior sensibilidade em relação à PCR convencional, de acordo com a análise *in silico*, os iniciadores prospectados neste trabalho são capazes de detectar pelo menos 40 espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, em comparação com as 25 espécies com o protocolo de PCR multiplex convencional (Uphoff & Drexler, 2002) adotado atualmente na rotina do SETBI.

O kit comercial *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) é a única alternativa disponível no mercado e na literatura que utiliza a metodologia de qPCR para a detecção das espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* preconizadas pela FE 7.0 de forma específica. De acordo com o fabricante, este produto pode gerar resultados em menos de 5 horas, com sensibilidade de detecção de menos de 10 cópias de DNA por reação, e de até 0,4 UFC de *Mycoplasma* sp. Além disso, possui especificidade comprovada, podendo detectar pelo menos 90 espécies da classe *Mollicutes*, incluindo as espécies recomendadas pela FE 7.0. Como a validação do kit foi realizada a partir de DNA extraído de culturas celulares contaminadas com algumas espécies de *Mycoplasma* sp., se torna necessária a realização de um novo processo de validação frente aos produtos cuja composição é de maior complexidade, como os imunobiológicos e insumos de processos de Bio-Manguinhos.

Apesar das vantagens acima, um único kit permite a realização de apenas 100 reações, o que na realidade significa a testagem de um número ainda menor de amostras devido à necessidade de inclusão dos controles nos ensaios e uso de mais de uma replicata para cada amostra-teste. Como o valor de comercialização deste produto possui um custo elevado, a sua implementação na rotina laboratorial do controle de qualidade microbiológico de Bio-Manguinhos, que analisa dentre diversos produtos os imunobiológicos e insumos de processos, se torna inviável.

O desenvolvimento da metodologia de qPCR *in house*, que utiliza o mesmo sistema de detecção - SYBR[®] Green- do kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) para a detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* por qPCR, e se mostrou equivalente nos ensaios comparativos com diferentes quantidades de UFC desses microrganismos em relação ao kit comercial, detectando essas bactérias sem diferença significativa nos valores de C_q , inclusive na quantidade de 0,4 UFC, que é um dos limites estabelecidos no kit.

Ainda, comparando o LD de ambos os protocolos de qPCR, a metodologia *in house* se mostrou equivalente ao kit *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]), cujo fabricante afirma ser capaz de detectar menos de 10 cópias de DNA por reação.

Além disso, os iniciadores prospectados para a qPCR *in house* se mostraram adequados nos ensaios de especificidade por não amplificarem espécies de bactérias filogeneticamente relacionadas a *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, apresentando especificidade comprovada *in vitro*, como afirma ser o *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) pelo fabricante. Por fim, o protocolo de qPCR *in house* apresenta a mesma rapidez de execução dos ensaios do que o *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]) uma vez que utiliza a mesma metodologia de detecção e apresenta um custo inferior em 89 % para sua implementação em comparação com o kit comercial (cálculo realizado em 13 de novembro de 2014).

4.7- Avaliação da interferência de matriz

A susceptibilidade das reações de PCR à presença de inibidores é um fenômeno bem estabelecido na literatura (Bustin & Nolan, 2003; Bustin, 2005), pois estes afetam diretamente a eficiência da reação e, conseqüentemente, a robustez da metodologia. Uma vez que estes interferentes podem distorcer os resultados do ensaio, como gerar resultados falso-negativos em ensaios de detecção de patógenos, se torna essencial o seu estudo durante o estabelecimento de um novo desenho experimental (Nolan et al., 2006; Huggett et al., 2008; Bustin et al., 2009).

Dentre os imunobiológicos produzidos em Bio-Manguinhos se destaca a vacina de Febre Amarela, a qual é avaliada pelo CQ durante a sua fabricação (produto intermediário- suspensão viral) e na fase final antes do envase (PAG). Dentre os componentes de sua formulação complexa, é possível que existam potenciais inibidores da reação de qPCR para a detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* como soluções estabilizantes, ou até mesmo DNA residual oriundo própria matriz em que é produzida a vacina- embrião de galinha. Seguindo esse racional, outros imunobiológicos como a vacina de sarampo, caxumba e rubéola, que é produzida em substratos celulares e células diploides, ou insumos de processos (soros animais, que contém elevada quantidade de proteína), necessitam também de avaliação quanto à sua capacidade de inibir as reações de qPCR.

4.7.1- Suspensão viral de vacina de Febre Amarela

4.7.1.1- Ensaio com os de iniciadores F3R3 utilizando *pellet* de suspensão viral

A natureza das substâncias interferentes é diversa (Izraeli et al., 1991; Akane et al., 1994; Al-Soued et al., 2000), e uma das formas de avaliar seu efeito nas reações de PCR é a utilização das amostras aditadas intencionalmente com o controle positivo (Nolan et al., 2006; Huggett et al., 2008).

De acordo com a DI 1245, para a detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* por PCR convencional multiplex, as amostras devem ser centrifugadas para a separação das células potencialmente contaminadas, uma vez que essa bactéria é um patógeno intracelular.

A partir do gráfico de amplificação na figura 4.42 e da tabela 4.37, foi possível observar a interferência do *pellet* de suspensão viral na reação de qPCR *in house* com o par F3R3 através da proximidade de C_q das suspensões virais contaminadas com 2 e 0,2 UFC/ μ L de *A. laidlawii* em comparação com os valores obtidos nas reações com o DNA extraído de da amostra livre de contaminantes. Da mesma forma, pela análise da curva de dissociação, o DNA da cultura pura apresenta pico único bem definido em T_m de aproximadamente 75 °C, enquanto que os DNA extraídos do *pellet* de suspensão viral, aditada e não aditada, apresentam picos de base larga e com T_m de aproximadamente 73 °C, não permitindo uma boa diferenciação entre amostras positivas para *Mycoplasma* sp. ou livres de contaminação.

Tabela 4.37: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com os iniciadores F3R3 utilizando *pellet* extraído de: suspensão viral livre de micoplasmas, suspensão viral aditada com *A. laidlawii* e de *pellet* de cultura pura de *A. laidlawii*.

Amostra		C_q	T_m
Suspensão viral	<i>Pellet</i>	34,40	72,60
		33,45	73,11
	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μ L de <i>A. laidlawii</i>)	32,57	74,13
		31,92	74,64
	<i>Pellet</i> (0,2 UFC/ μ L de <i>A. laidlawii</i>)	34,18	73,79
		33,72	74,47
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μ L)	31,76	74,82
		31,44	75,16
	<i>Pellet</i> (0,2 UFC/ μ L)	33,82	74,82
		-	-

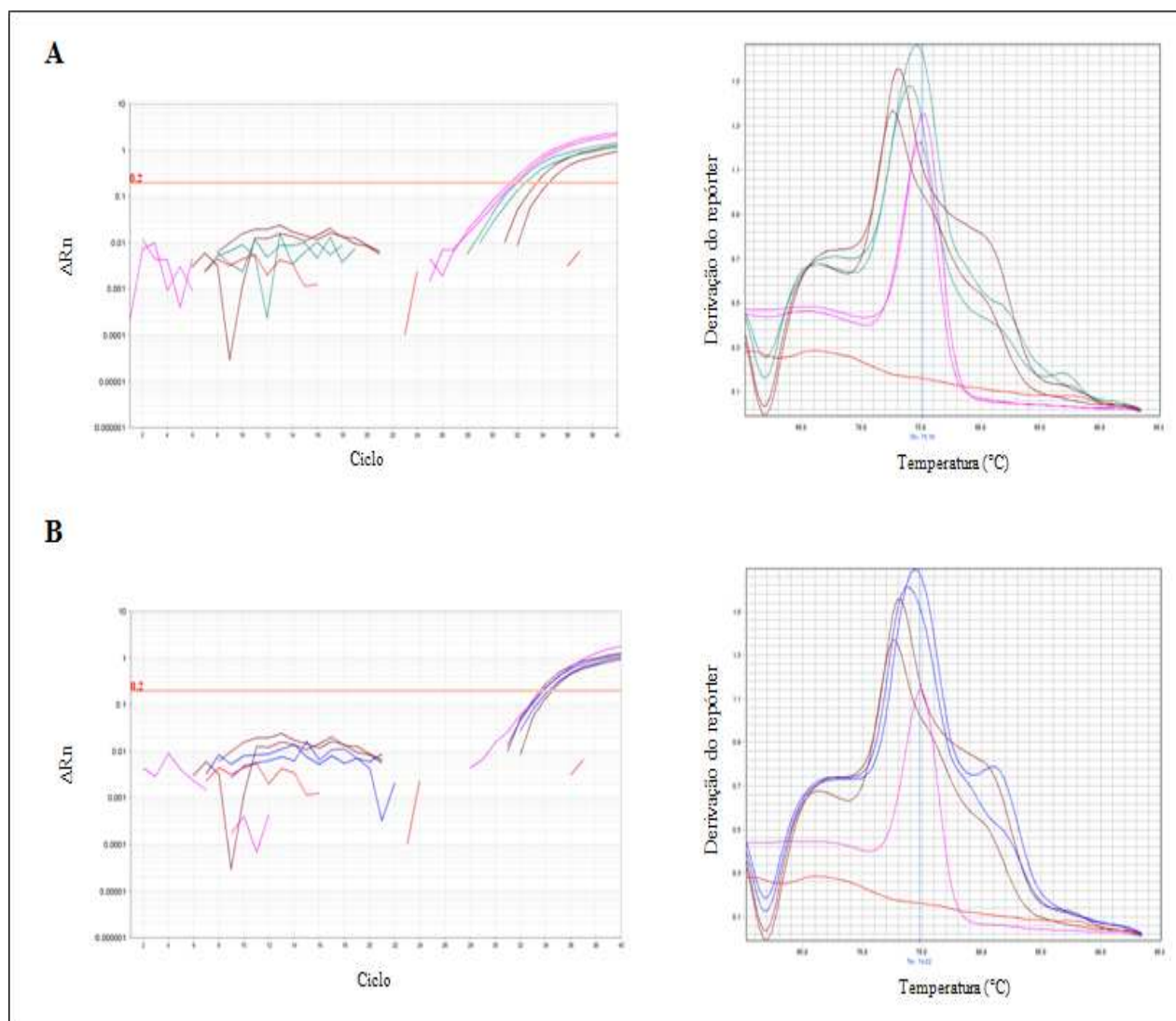


Figura 4.42: Avaliação da interferência do *pellet* de suspensão viral contaminado com 2 e 0,2 UFC de *A. laidlawii*, respectivamente. A: 2 UFC de *pellet* de cultura de *A. laidlawii* (em rosa), *pellet* de suspensão viral (em marrom), *pellet* de suspensão viral contaminada com 2 UFC de *A. laidlawii* (em verde). B: 0,2 UFC de *pellet* de cultura de *A. laidlawii* (em rosa), *pellet* de suspensão viral (em marrom), *pellet* de suspensão viral contaminada com 0,2 UFC de *A. laidlawii* (em azul). Controle negativo de qPCR (em vermelho).

4.7.1.2- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando sobrenadante de suspensão viral

Apesar de rotineiramente a pesquisa de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* ser feita a partir do *pellet* da amostra, essas bactérias podem ser encontradas no sobrenadante na sua forma livre. Além disso, por serem as menores bactérias desprovidas de parede celular, elas possuem baixo peso, e por isso, o protocolo de centrifugação da amostra que antecede a extração de DNA não é o suficiente para deslocar essas bactérias para a região do *pellet*. Portanto, a utilização apenas do *pellet* promove

um desperdício de material potencialmente contaminado, e a possível liberação de um resultado falso-negativo.

Através do uso apenas do sobrenadante de suspensão viral contaminada foi possível obter uma curva de dissociação com pico único e com a mesma T_m do controle positivo (cultura pura de *A. laidlawii*) (Figura 4.43) (Tabela 4.38). Entretanto, como não houve amplificação 2 UFC extraídas de sobrenadante de cultura pura de *A. laidlawii*, não foi possível avaliar a interferência do sobrenadante de suspensão viral na inibição da reação de qPCR *in house* com F3R3.

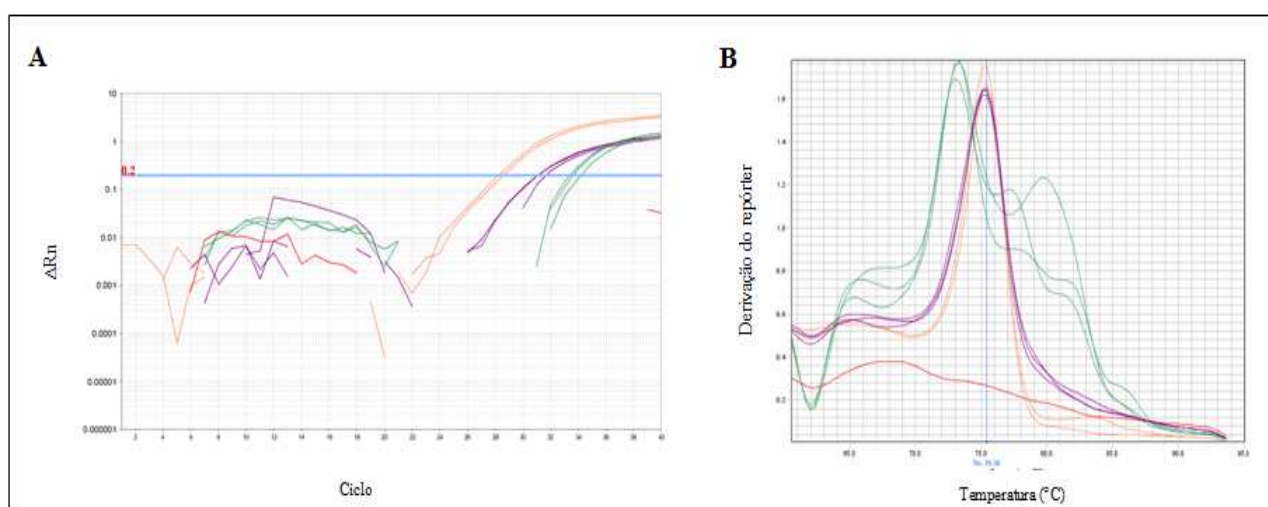


Figura 4.43: Ensaio de qPCR *in house* com 2 UFC de DNA extraído de sobrenadante de suspensão viral contaminada com *A. laidlawii*. **A:** Gráfico de amplificação de 2 UFC extraído de sobrenadante de suspensão viral (em roxo), 2 UFC extraído de *pellet* de cultura pura de *A. laidlawii* (em laranja), DNA extraído de sobrenadante de suspensão viral livre de contaminantes (em verde) e controle negativo de qPCR (em vermelho). **B:** Curva de dissociação de 2 UFC extraído de sobrenadante de suspensão viral (em roxo), 2 UFC extraído de *pellet* de cultura pura de *A. laidlawii* (em laranja), DNA extraído de sobrenadante de suspensão viral livre de contaminantes (em verde) e controle negativo de qPCR (em vermelho).

Tabela 4.38: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com sobrenadante extraído de: suspensão viral livre de micoplasmas, suspensão viral aditada com *A. laidlawii* e de cultura pura de *A. laidlawii*.

Amostra		C_q	T_m
Suspensão viral	Sobrenadante	34,07	68,17
		33,32	72,99
		33,56	73,33
		31,67	75,22
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	Sobrenadante (2 UFC/ μ L)	31,07	75,22
		31,09	75,22
		37,09	71,27
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	Matriz total (2 UFC/ μ L)	-	-
		-	63,70
		28,57	75,39
	30,05	74,88	
	28,26	75,22	

Como foi testado no mesmo ensaio o DNA extraído de matriz total de cultura pura no volume de 100 μL , com concentração final de 2 UFC/ μL , foi possível observar uma diferença de C_q entre esta e o sobrenadante aditado com a mesma quantidade de *A. laidlawii* (tabela 4.38). Dentre as possíveis justificativas para a diferença encontrada pode-se questionar que, durante o processo de extração de DNA, não tenha sido extraída a mesma quantidade de UFC do sobrenadante em relação à cultura pura, uma vez que apenas cerca de 500 μL , do total de 1mL de amostra de suspensão viral aditada, foram retirados do sobrenadante para a extração. Dessa forma, considerando a homogeneização perfeita da amostra com *A. laidlawii*, parte das bactérias utilizadas na contaminação foram descartadas juntamente como restante de sobrenadante e o *pellet* de suspensão viral não utilizados.

Além disso, a eficiência da extração pode ter sido diferente entre a cultura de *A. laidlawii*, que ocorreu a partir do volume de 100 μL nos quais as bactérias estavam homogeneizadas, e o volume de sobrenadante de suspensão viral, cujo volume utilizado foi de 500 μL . Isso porque além de ser determinado pelo kit *PrepSEQ*TM (Life Technologies[®]) que o volume ideal para a extração é de 100 μL , não houve ajuste de volume de reagentes para a extração do sobrenadante de suspensão viral, que excedeu em 5 vezes o volume estabelecido como o limite no kit.

Ainda, não pode ser descartada a possibilidade do sobrenadante de suspensão viral, assim como o *pellet*, também pode inibir a reação de qPCR *in house*.

4.7.1.3- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando *pellet* e sobrenadante de suspensão viral extraídos com o kit *Wizard*[®] *SV Genomic DNA Purification System* (Promega[®])

No intuito de avaliar a participação do kit *PrepSEQ*TM (Life Technologies[®]) na eficiência da extração e na reação de amplificação, foi realizado um estudo comparativo por qPCR *in house* utilizando DNA com 2 UFC de *A. laidlawii* extraído de *pellet* e sobrenadante de suspensão viral aditados com o kit de extração *Wizard*[®] *SV Genomic DNA Purification System* (Promega[®]).

Conforme a da tabela 4.39 e a figura 4.44 é evidente a interferência do *pellet* de suspensão viral contaminado na reação de qPCR *in house* através da análise da curva de dissociação desta amostra, que apresenta formação de picos inespecíficos, mas que não são visualizados quando testado o sobrenadante contaminado com a mesma quantidade de *A. laidlawii*.

Entretanto, pela análise de C_q na curva de amplificação, não há diferença entre o C_q do *pellet* aditado e da cultura pura de *A. laidwaii*, ao contrário do C_q do sobrenadante, cuja diferença para a cultura é de aproximadamente 5 C_q s. Essa diferença na sensibilidade de detecção de *A. laidlawii*

quando utilizado sobrenadante pode ser explicada devido ao descarte de parte da cultura contaminante ao se utilizar apenas 500 μL de sobrenadante, conforme já discutido anteriormente. Além disso, o kit de extração aplicado nesse ensaio foi diferente, e utilização de colunas de extração, ao contrário de esferas magnéticas, pode justificar a menor eficiência durante o processo de extração (Pan et al., 2014). Ainda, a fluorescência detectada no *pellet* pode ter sido superior à do sobrenadante devido à ligação inespecífica do SYBR[®] Green (Life Technologies[®]) ao DNA de células de galinha presentes em grande quantidade nessa fração da amostra (Life Technologies[®], 2012).

Por fim, a ocorrência de amplificação a partir de sobrenadante de cultura pura de *A. laidlawii* indica que a centrifugação realizada para a retirada desta fração de amostra não é suficiente para manter essas bactérias na região do *pellet*. Como é utilizado na SETBI apenas o *pellet* para a detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, é sugerido que o processo de extração de DNA seja revisado, uma vez que em casos de baixa contaminação (que é o esperado no ambiente industrial) (Deutschmann et al., 2010), o resultado poderia ser liberado como um falso-negativo.

Tabela 4.39: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com sobrenadante e *pellet* extraído de suspensão viral livre de micoplasmas, suspensão viral aditada com *A. laidlawii* e de cultura pura de *A. laidlawii* com o kit Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System (Promega[®]).

Amostra	C_q	T_m	
<i>Pellet</i>	36,99	72,46	
	37,10	71,11	
Sobrenadante	-	61,82	
	-	61,65	
Suspensão viral	30,83	74,48	
	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μL de <i>A.laidlawii</i>)	30,51	73,98
	36,24	73,13	
	Sobrenadante (2 UFC/ μL de <i>A. laidlawii</i>)	35,84	74,99
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μL)	31,32	75,33
		32,51	75,16
	Sobrenadante (2 UFC/ μL)	29,30	74,65
	29,33	74,99	

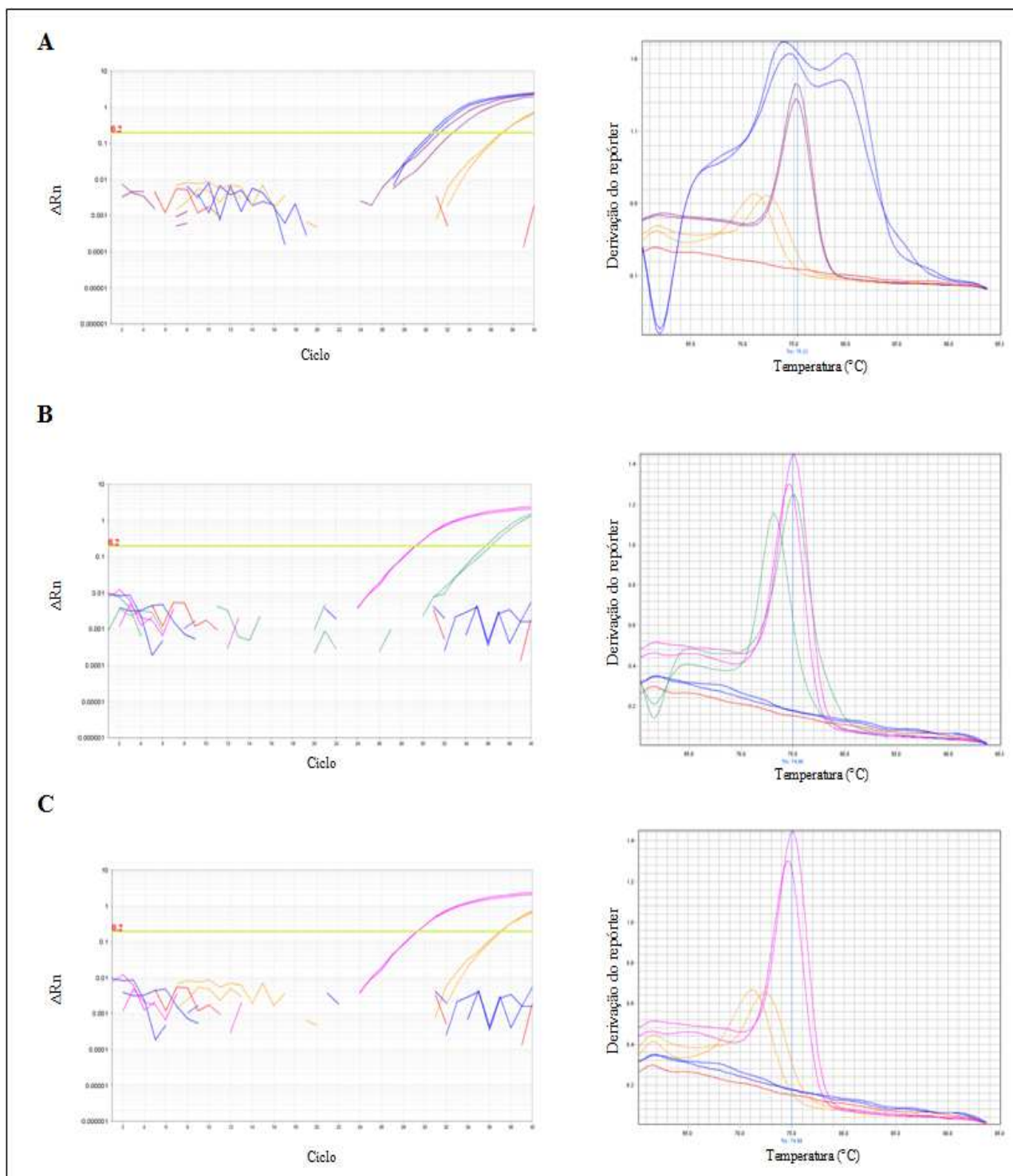


Figura 4.44: Ensaio de qPCR *in house* com 2 UFC de DNA extraído de sobrenadante e *pellet* de suspensão viral contaminada com *A. laidlawii* com o kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega®). **A:** Amplificação de 2 UFC de *A. laidlawii* de *pellet* de suspensão viral (em azul), DNA de *pellet* de suspensão viral livre de contaminantes (em laranja) e 2 UFC de *pellet* de cultura pura de *A. laidlawii* (em roxo). **B:** Amplificação de 2 UFC de *A. laidlawii* de sobrenadante de suspensão viral (em verde), DNA de sobrenadante de suspensão viral livre de contaminantes (em azul) e 2 UFC de sobrenadante de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa). **C:** Amplificação de 2 UFC de sobrenadante de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa), e reações com DNA extraído de *pellet* (amarelo) e sobrenadante (azul) de suspensão viral sem adição de bactérias.

4.7.1.4- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando matriz total de suspensão viral

Como o processo de centrifugação é uma etapa a mais no processo de extração, além de gerar o descarte de material potencialmente contaminado, foi testada interferência da matriz total de suspensão viral, ou seja, sem a separação de *pellet* e sobrenadante, nas reações de qPCR *in house* com os oligonucleotídeos F3R3.

O kit de extração *PrepSEQ*TM (Life Technologies[®]) apresenta como limitante o volume de 100 μ L de amostra inicial para a extração de DNA. Entretanto, como a retirada apenas deste volume poderia não ser suficiente para detectar uma baixa contaminação, além de não ter sido estabelecido a eficiência do kit utilizando volumes acima do limite, os volumes de 500, 400, 300, 200 e 100 μ L de matriz total, aditadas e livres de contaminação, também foram utilizados para a extração de DNA e posterior ensaio por qPCR *in house*.

Analisando as curvas de dissociação geradas para cada volume de matriz total, aditadas e não aditadas, foi possível observar a interferência da matriz total apenas quando esta é testada livre de contaminantes, apresentando picos inespecíficos e amplificação a partir de $C_q = 33$ (Figura 4.45) (Tabela 4.40). Já a amostra aditada com 10 UFC de *A. laidlawii*, em todos os volumes, apresenta curvas de dissociação com pico único com T_m de 74,38 (média; dp= 0,40), coincidindo com os valores de T_m de cultura pura de *A. laidlawii* (média= 74,67; dp= 0,26).

Em relação à capacidade de inibição dos diferentes volumes de matrizes, não foi possível chegar a uma conclusão com valores bem estabelecidos, uma vez que foram aplicadas também diferentes quantidades de UFC de *A. laidlawii*: cada 100 μ L de amostra estavam contaminadas com 10 UFC de *A. laidlawii*. Logo, 500 μ L de amostra continham 50 UFC deste microrganismo, e assim por diante. Entretanto, foi possível inferir que existe influência da matriz de suspensão viral na inibição da reação de qPCR, uma vez que não ocorreu a diminuição do C_q de amplificação conforme foi aumentada a quantidade de UFC de *A. laidlawii* (tabela 4.41). Isso também pode ser visto pela diferença de aproximadamente 3 C_q (diferença das médias) entre o C_q de 10 UFC de *A. laidlawii* extraído de 100 μ L de matriz total em comparação com a mesma quantidade de bactéria extraída de cultura pura.

De acordo com os resultados do experimento anterior, foram selecionados os volumes de 500, 200 e 100 μ L de matriz total de suspensão viral para a contaminação com 2 UFC de *A. laidlawii*, no intuito de melhor observar o efeito de inibição em relação ao volume de matriz (Figura 4.46).

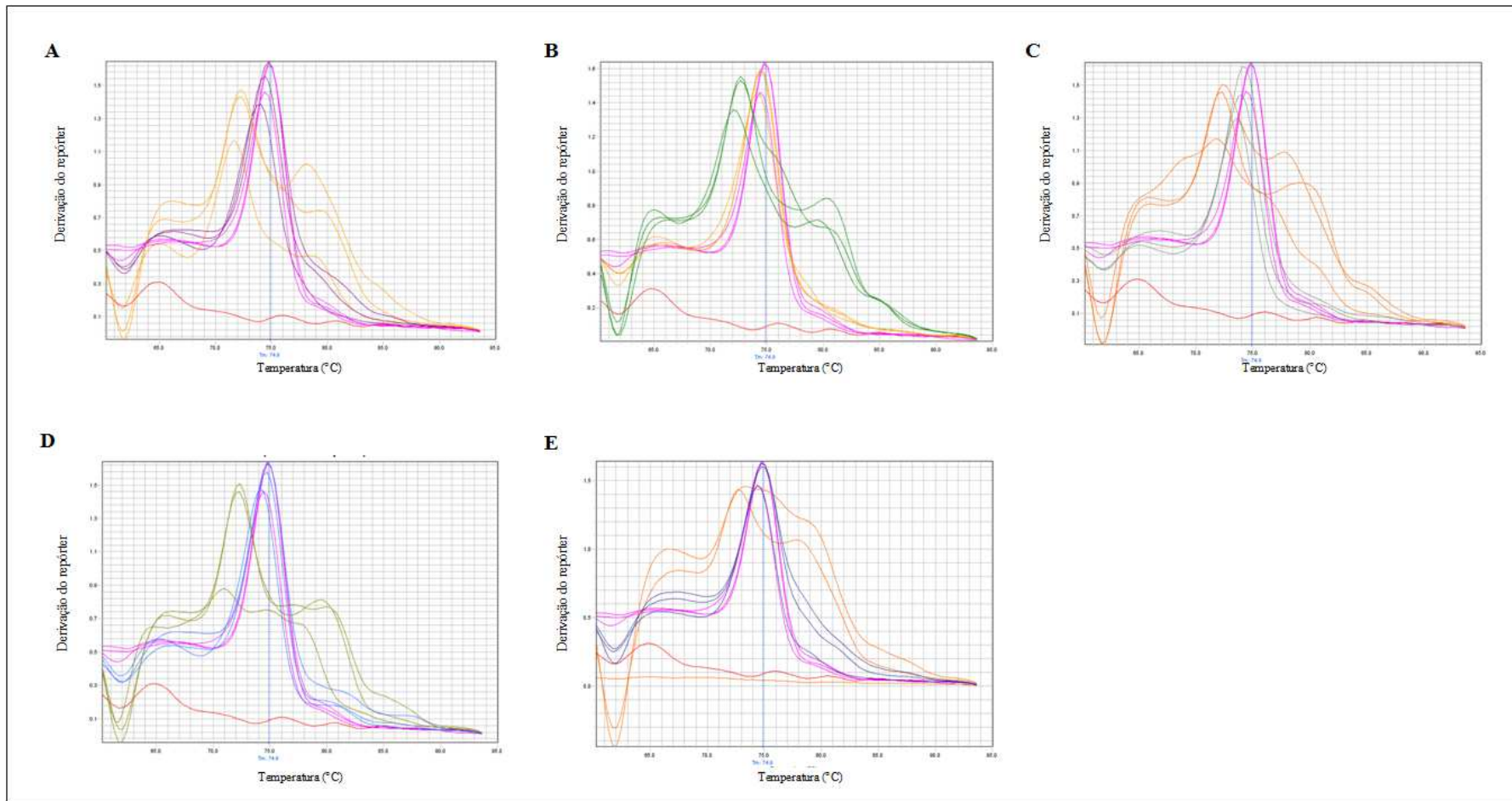


Figura 4.45: Ensaio de qPCR *in house* com 10 UFC de DNA extraído de matriz total de suspensão viral contaminada com *A. laidlawii*. **A-E:** Curvas de dissociação dos volumes de 500, 400, 300, 200 e 100 μ L de suspensão viral, aditadas e não aditadas com *A. laidlawii*, respectivamente. **A:** 10 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa), 10 UFC de matriz de suspensão viral (em roxo), e DNA de matriz de suspensão viral livre de contaminantes (em amarelo). **B:** 10 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa), 10 UFC de matriz de suspensão viral (em amarelo), e DNA de matriz de suspensão viral livre de contaminantes (em verde). **C:** 10 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa), 10 UFC de matriz de suspensão viral (em verde), e DNA de matriz de suspensão viral livre de contaminantes (em laranja). **D:** 10 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa), 10 UFC de matriz de suspensão viral (em azul), e DNA de matriz de suspensão viral livre de contaminantes (em mostarda). **E:** 10 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa), 10 UFC de matriz de suspensão viral (em azul), e DNA de matriz de suspensão viral livre de contaminantes (em laranja).

Tabela 4.40: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com DNA extraído de 500 -100 μ L de matriz total de suspensão viral aditada com 10 UFC de *A. laidlawii* e de suspensão viral livre de micoplasmas.

Volume de suspensão viral	C_q	T_m	C_q	T_m
	Aditada (10 UFC/ 100 μ L)		Livre de contaminantes	
500 μ L	27,76	73,87	33,88	72,33
	27,65	74,39	35,35	71,64
	27,46	74,73	33,75	72,15
400 μ L	27,58	74,22	34,28	72,15
	27,41	74,56	33,39	72,67
	27,53	74,39	33,62	72,67
300 μ L	27,98	73,53	34,80	71,81
	27,70	73,87	33,14	72,50
	27,61	74,22	33,34	72,15
200 μ L	27,88	74,22	35,88	70,95
	27,73	74,73	33,23	72,15
	27,88	74,73	33,10	72,33
100 μ L	29,06	74,39	-	64,59
	29,10	74,90	33,09	72,67
	29,14	74,90	33,21	73,36

Tabela 4.41: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com DNA correspondente a 10 UFC extraído de cultura pura de *A. laidlawii*.

Amostra	C_q	T_m
10 UFC de <i>A. laidlawii</i> (matriz total)	26,56	74,39
	26,14	74,90
	26,01	74,73

A partir dos resultados descritos na tabela 4.42, foi observado o efeito de inibição de reação de qPCR *in house* com F3R3 apenas nos volumes de 200 e 500 μ L de suspensão viral contaminadas. Apesar do aumento no C_q , a curva de dissociação não variou de acordo com o volume, apresentando pico com T_m de 75,13 (média; dp= 0,38), e um pequeno pico secundário de maior T_m (destacado na figura 4.44 na ponta da seta), mas que não interfere na interpretação dos resultados.

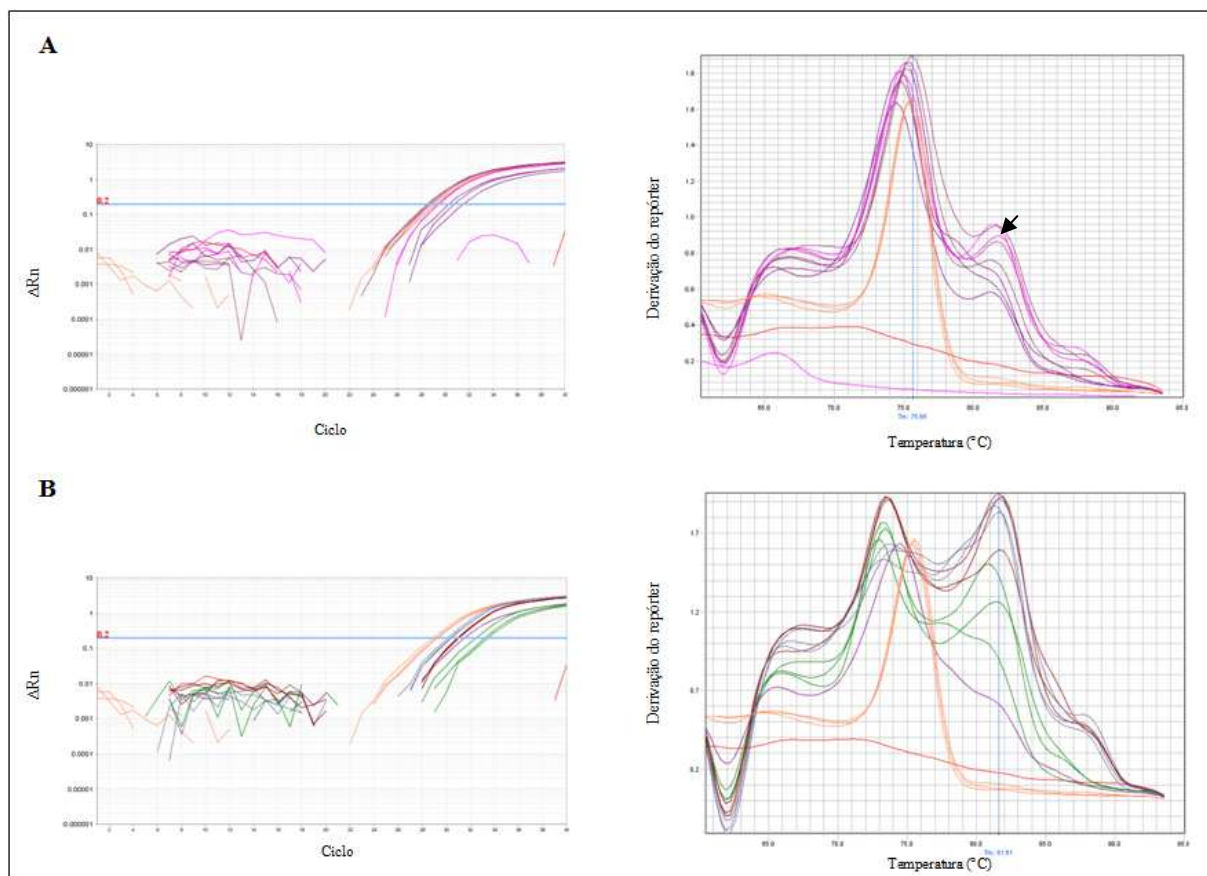


Figura 4.46: Ensaio de qPCR *in house* com 2 UFC de DNA extraído de 500, 200 e 100 μL de matriz total de suspensão viral contaminada com *A. laidlawii*. **A:** Curvas de amplificação e de dissociação da cultura pura de *A. laidlawii* (em laranja) e das amostras de suspensão viral aditadas com esta bactéria (demais cores). Em destaque na ponta da seta, picos secundários nas curvas de amostras contaminadas. **B:** Curvas de amplificação e de dissociação da cultura pura de *A. laidlawii* (em laranja) e das amostras de suspensão viral livre de contaminates (demais cores).

Tabela 4.42: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com DNA extraído de 500, 200 e 100 μL de: matriz total de suspensão viral aditada com 10 UFC de *A. laidlawii* e de suspensão viral livre de micoplasmas, e DNA extraído de 10 UFC de cultura pura de *A. laidlawii*.

Amostra		C_q	T_m
Suspensão viral (matriz total) aditada com 10 UFC	500 μL	31,48	74,46
		30,73	74,80
		30,27	74,63
	200 μL	29,46	74,97
		29,42	75,14
		28,51	75,14
	100 μL	28,81	75,31
		28,64	75,65
		28,87	75,48
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	29,29	75,48	
	29,10	75,31	
	-*	-*	

* esta replicata foi retirada da análise por ausência de amplificação.

Ao contrário do ensaio relatado na figura 4.43, não houve interferência da matriz de 100 µL de suspensão viral na detecção de 2 UFC de *A. laidlawii*. Como só houve a mudança da quantidade de UFC da bactéria testada, mantendo-se, portanto, o mesmo processo de extração e de amplificação, não foi possível chegar a uma explicação para a discrepância de resultados.

As amostras biológicas, como a suspensão viral da vacina de febre amarela, são complexas e podem conter substâncias inibidoras que podem prejudicar a eficiência da qPCR ou a análise de resultados (Kubista et al., 2006).

Como pode ser observado através do estudo com diferentes frações da matriz desta amostra, os melhores resultados obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com F3R3, tanto pela análise de C_q quanto pela curva de dissociação, foi com a matriz total. É sugerido que a utilização de *pellet* pode concentrar os possíveis interferentes presentes na amostra, que seriam, portanto, adicionados em maiores quantidades à reação, intensificando o seu efeito prejudicial na qPCR. Já o uso apenas do sobrenadante, apesar de conter menores quantidades de substâncias que poderiam atrapalhar à qPCR, também prejudica a sensibilidade do teste conforme pode ser visto na tabela 4.38, pois limita a detecção dos contaminantes a somente uma fração da amostra, desprezando o restante do material que poderia estar no *pellet*.

4.7.1.5- Ensaio com os iniciadores F1R1 utilizando *pellet* de suspensão viral

Ao contrário dos resultados obtidos com *pellet* de suspensão viral contaminado com *A. laidlawii* (amplificado por F3R3), o conjunto F1R1 amplificou a mesma fração desta amostra contaminada com *M. orale* sem apresentar interferência nas curvas de dissociação, com pico único com T_m de 76,8 °C (média; dp= 0,44), coincidindo com a T_m do controle positivo (cultura pura de *M. orale*), e com C_q próximo dos controles de mesma quantidade de UFC. Adicionalmente, foi possível detectar quantidades de DNA inferiores a 1 UFC de *M. orale* em *pellet* de suspensão viral, demonstrando a aplicabilidade deste conjunto de iniciadores no pior cenário quando comparado com F3R3 (Tabela 4.43) (Figura 4.47).

Entretanto, como já foi discutido anteriormente sobre a importância do sobrenadante na detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, é sugerido a utilização da matriz total para os ensaios de rotina para a identificação destes contaminantes nos produtos testados na rotina do SETBI. Ainda, apesar da presença de picos na curva de dissociação da amostra sem contaminação com T_m próxima do alvo não prejudicar a interpretação dos resultados, a

utilização de matriz total pode diminuir a sua interferência, assim como ocorreu com o conjunto F3R3.

Resta ainda estabelecer se a utilização de matriz total é adequada para os outros conjuntos de iniciadores da qPCR *in house* (e qual o seu melhor volume para que possa ser adotado na rotina para a extração), e baseado nisso, determinar o LD (em número de cópias de DNA e em UFC) de cada um dos quatro pares de oligonucleotídeos da qPCR *in house* nas amostras de suspensão viral.

Tabela 4.43: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com DNA extraído de suspensão viral livre de micoplasmas, de *pellet* de suspensão viral aditada com *M. orale*, e DNA extraído de cultura pura de *M. orale*.

Amostra		C_q	T_m
Suspensão viral	<i>Pellet</i>	36,25	77,20*
		35,23	77,20*
Suspensão viral aditada com <i>M. orale</i>	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μ L)	27,89	76,01
		27,51	76,86
	<i>Pellet</i> (0,2 UFC/ μ L)	31,63	76,35
		31,49	77,38
	<i>Pellet</i> (0,02 UFC/ μ L)	33,22	77,04
		33,52	77,04
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	2 UFC/ μ L	27,00	76,69
		26,61	77,04
	0,2 UFC/ μ L	29,86	77,04
		32,71	75,67
	0,02 UFC/ μ L	33,03	76,86
		33,64	76,86

*picos com valor derivativo elevado, porém com perfil diferente do gerado em curva de dissociação específica de *M. orale*.

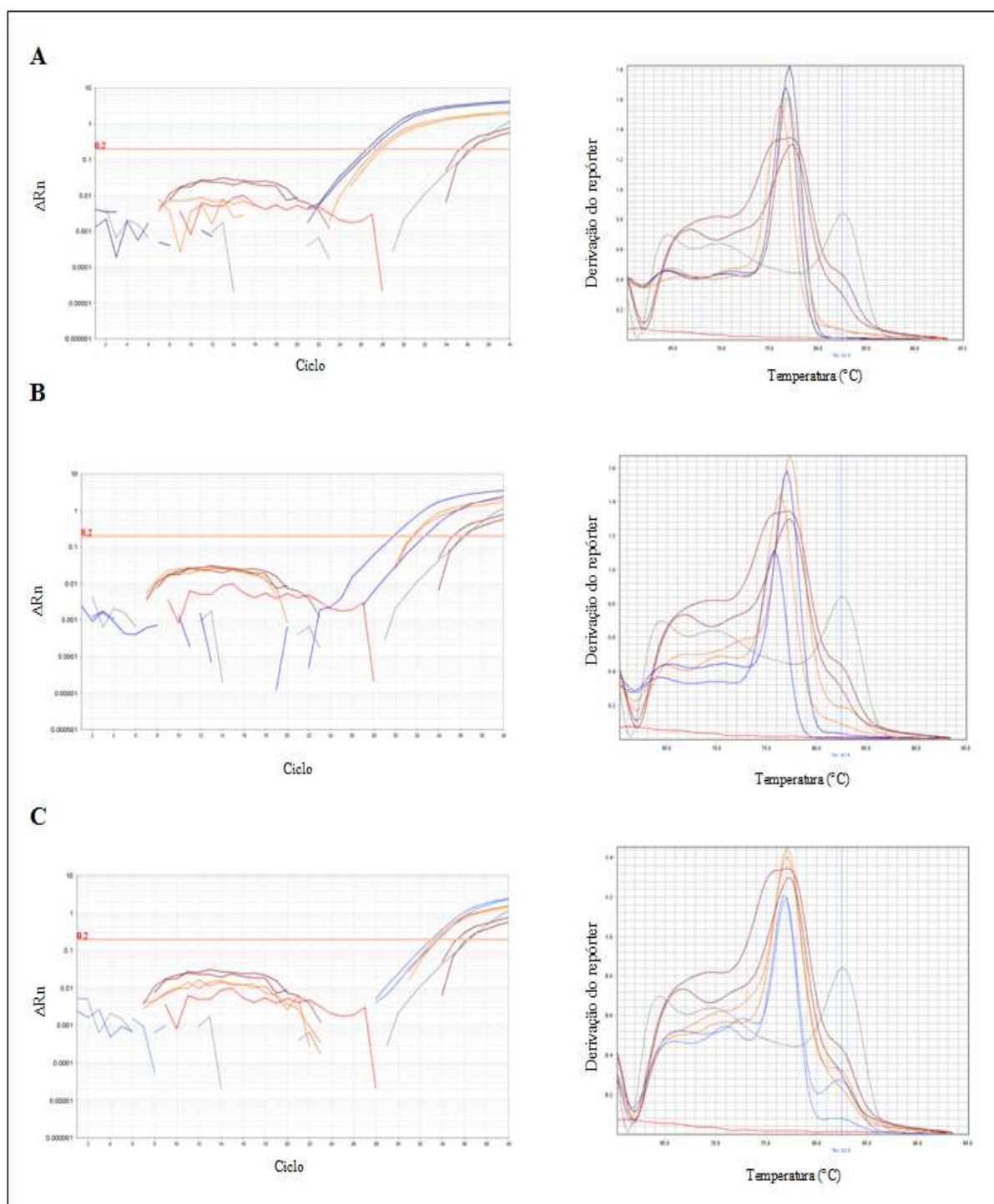


Figura 4.47: Ensaio de interferência de matriz com *pellet* de suspensão viral aditado com *M. orale*. (Da esquerda para a direita) **A:** Curva de amplificação de 2 UFC de cultura pura de *M. orale* (em azul), 2 UFC de *pellet* de suspensão viral contaminada (em laranja), e DNA extraído de *pellet* livre de contaminação (em marrom), e suas respectivas curvas de dissociação. **B:** Curva de amplificação de 0,2 UFC de cultura pura de *M. orale* (em azul), 2 UFC de *pellet* de suspensão viral contaminada (em laranja), e DNA extraído de *pellet* livre de contaminação (em marrom), e suas respectivas curvas de dissociação. **C:** Curva de amplificação de 0,02 UFC de cultura pura de *M. orale* (em azul), 0,02 UFC de *pellet* de suspensão viral contaminada (em laranja), e DNA extraído de *pellet* livre de contaminação (em marrom), e suas respectivas curvas de dissociação. Em vermelho o controle negativo de qPCR e em cinza o controle de extração.

4.7.2- PAG de Vacina de Febre Amarela

4.7.2.1- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando *pellet* de PAG

Uma vez que as reações de amplificação com os iniciadores F3R3 apresentaram algumas dificuldades nas reações de qPCR com suspensão viral, inicialmente este mesmo conjunto foi testado para as amostras de PAG.

Assim como no ensaio com suspensão viral, foi realizada a amplificação de 2 e 0,2 UFC de *A. laidlawii* extraída de *pellet* de cultura pura e de *pellet* de PAG contaminado com o kit de extração *MycoSEQ*[®] (Life Technologies[®]), de forma a seguir o procedimento da SETBI, que utiliza essa fração da amostra para a extração de DNA.

O *pellet* de PAG contaminado, da mesma forma que o *pellet* de suspensão viral contaminado, apresenta interferência na curva de dissociação, pois os dois picos possuem valor derivativo de fluorescência elevado e com T_m próximos à T_m de *A. laidlawii*. Assim, esse mesmo padrão de pico poderia confundir uma amostra contaminada com uma que estivesse livre de micoplasmas (Tabela 4.44) (Figura 4.48).

Tabela 4.44: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com *pellet* extraído de: PAG livre de micoplasmas, PAG aditado com *A. laidlawii* e de cultura pura de *A. laidlawii*.

Amostra		C_q	T_m
PAG	<i>Pellet</i>	32,60	78,91
		31,87	78,21
	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μ L de <i>A. laidlawii</i>)	25,96	76,47
		25,84	77,34
	<i>Pellet</i> (0,2 UFC/ μ L de <i>A. laidlawii</i>)	28,08	76,99
		28,17	77,51
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μ L)	26,54	77,34
		26,67	77,51
	<i>Pellet</i> (0,2 UFC/ μ L)	30,59	76,99
		30,17	76,64

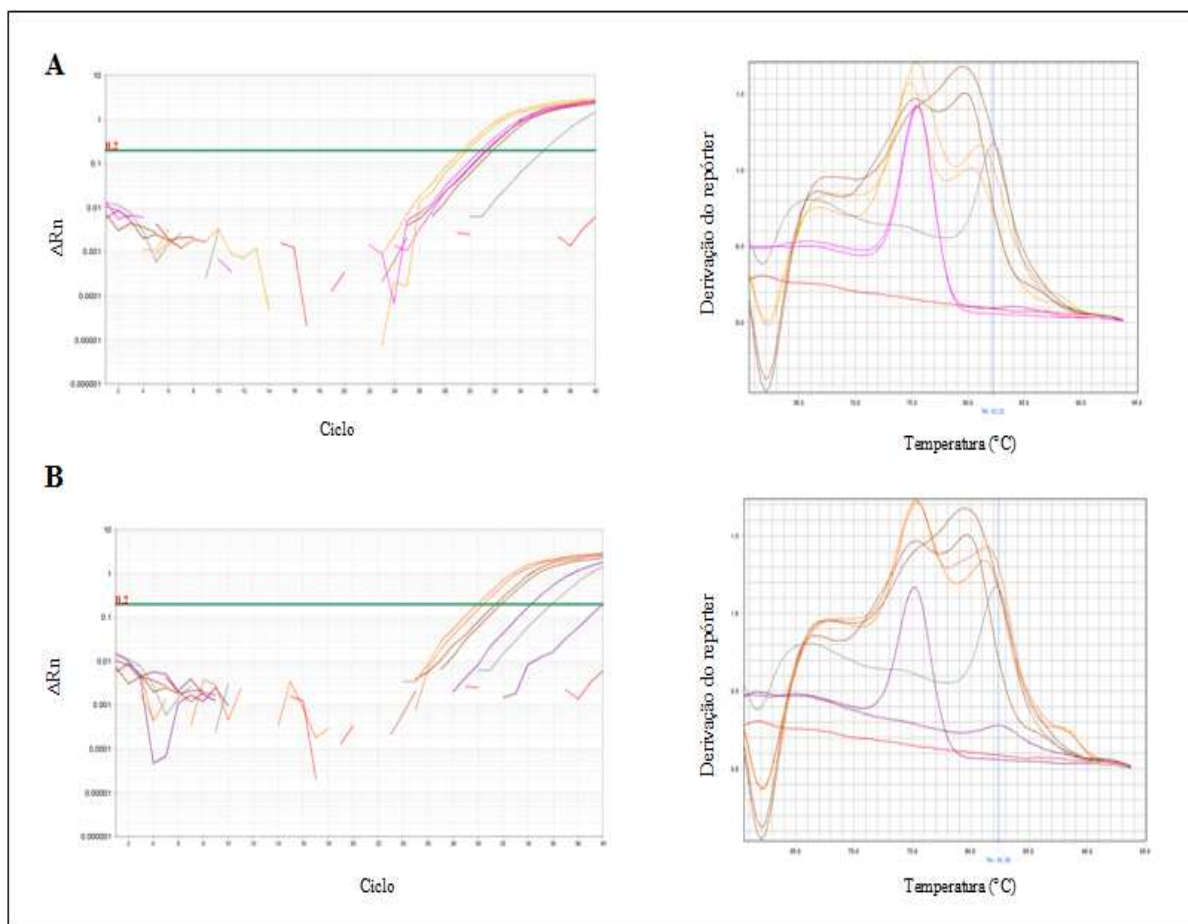


Figura 4.48: Avaliação da interferência do *pellet* de PAG contaminado com 2 e 0,2 UFC de *A. laidlawii*, respectivamente. **A:** 2 UFC de *pellet* de cultura pura *A. laidlawii* (em rosa), *pellet* de PAG (em marrom), *pellet* de PAG contaminada com 2 UFC de *A. laidlawii* (em laranja) e controle negativo de qPCR (em vermelho). **B:** 0,2 UFC de *A. laidlawii* (em roxo), *pellet* de suspensão viral (em marrom), *pellet* de PAG contaminada com 0,2 UFC de *A. laidlawii* (em verde). Controle negativo de qPCR em vermelho e controle de extração em cinza.

Apesar da liberação de um resultado por qPCR com sistema SYBR[®] Green (Life Technologies[®]) depender da análise em conjunto do C_q de amplificação com a curva de dissociação, o C_q de *pellet* de PAG sem a contaminação também apresentou valor esperado de amostras positivas que estivessem com baixa carga microbiana (Tabela 4.44), e portanto, não poderia servir de critério para liberação de resultados. Para solucionar esta questão, o valor de C_q da amostra negativa para *A. laidlawii* poderia ser estabelecido como o *cut-off* da reação. Entretanto, como em suspensão viral foram obtidos melhores resultados com outras frações que não o *pellet*, o mesmo procedimento anteriormente realizado de avaliação de outras frações da suspensão viral foi também adotado para PAG no intuito de detectar *A. laidlawii* por qPCR *in house*.

4.7.2.2- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando sobrenadante de PAG

O sobrenadante de PAG foi obtido a partir de centrifugação da amostra aditada com *A. laidlawii* ou livre de contaminantes utilizando o mesmo kit de extração do ensaio anterior. Conforme da figura 4.49, foi observado que o sobrenadante de PAG utilizado no processo de extração não foi capaz de gerar melhores resultados como os obtidos em suspensão viral, não sendo possível diferenciar uma amostra contaminada de uma negativa, nem por análise de C_q , cujos valores são muito próximos entre a amostra positiva e negativa, e nem por curva de dissociação, devido à presença de picos inespecíficos e de T_m diferente da T_m do alvo (Tabela 4.45).

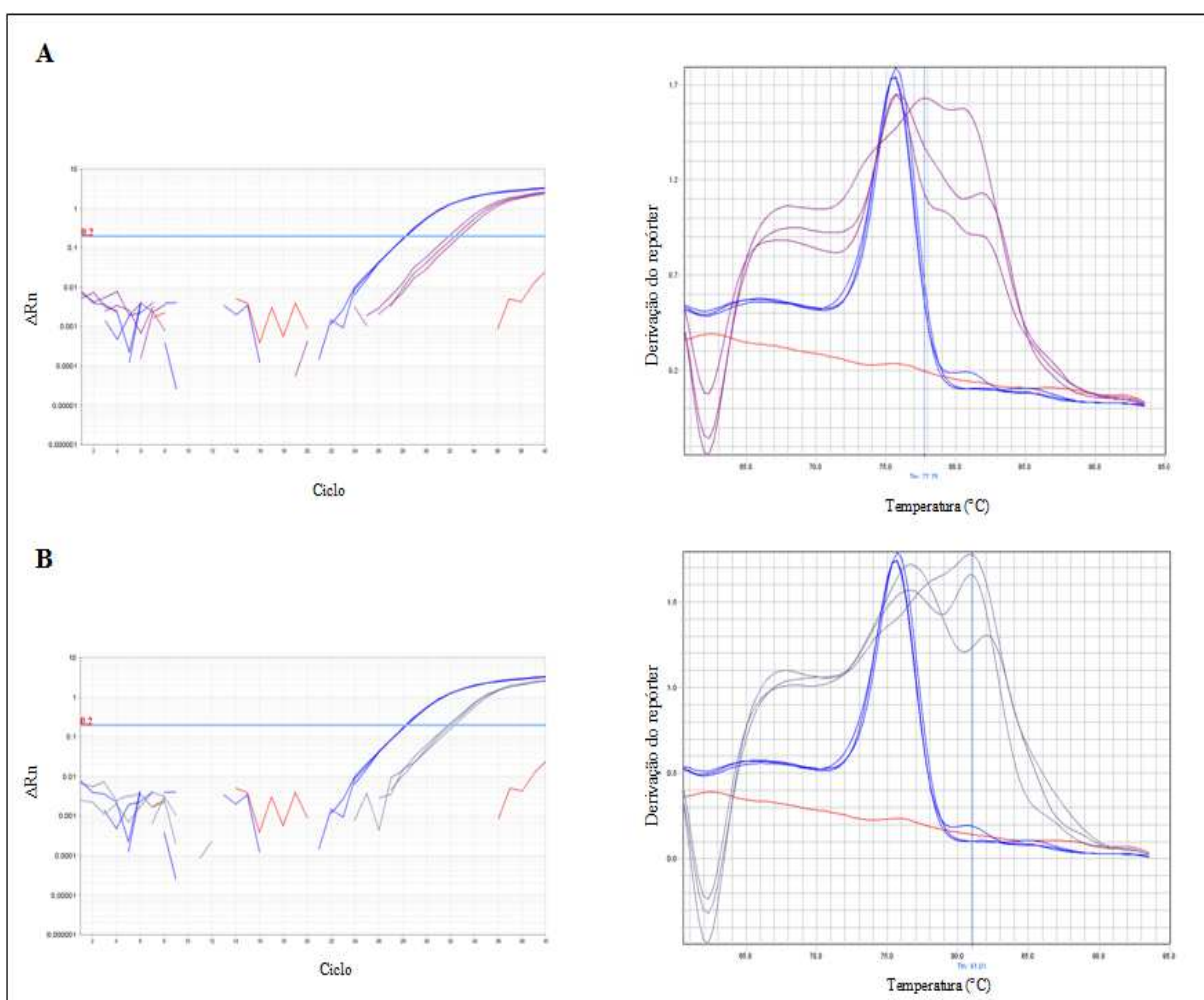


Figura 4.49: Ensaio de qPCR *in house* com 2 UFC de DNA extraído de sobrenadante de PAG contaminada com *A. laidlawii*. **A:** Gráfico de amplificação de 2 UFC extraído de sobrenadante de PAG contaminado (em roxo), 2 UFC extraído de *pellet* de cultura pura de *A. laidlawii* (em azul). **B:** Gráfico de amplificação de DNA extraído de sobrenadante de PAG livre de contaminantes (em cinza) e 2 UFC extraído de *pellet* de cultura pura de *A. laidlawii* (em azul). Em vermelho o controle negativo de qPCR.

Tabela 4.45: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com sobrenadante extraído de: PAG livre de micoplasmas, PAG aditado com *A. laidlawii* e de cultura pura de *A. laidlawii*.

Amostra		C_q	T_m
PAG	Sobrenadante	32,01	81,01
		31,86	76,72
		32,34	80,84
	Sobrenadante (2 UFC/ μ L de <i>A. laidlawii</i>)	32,44	75,86
		32,84	77,75
		31,94	75,69
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μ L)	28,21	75,52
		28,31	75,52
		28,32	75,69

4.7.2.3- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando *pellet* e sobrenadante de PAG extraídos com kit *Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System* (Promega[®])

Como a metodologia do kit de extração *MycoSEQ[®]* (Life Technologies[®]) utiliza esferas magnéticas, e estas poderiam ter interferido na reação anterior, foi testado o DNA extraído de *pellet* e de sobrenadante de PAG, aditado e sem microrganismos, com o kit *Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System* (Promega[®]) (Figura 4.50).

As reações de amplificação do *pellet* de PAG contaminado, assim como do PAG não aditado, apresentam picos inespecíficos de acordo com a curva de dissociação e valores de C_q de 30,98 (média; dp= 0,72), não sendo possível diferenciar, a partir do uso dessa fração de PAG, uma amostra positiva de uma negativa para *A. laidlawii* (Tabela 4.46).

O sobrenadante de PAG, assim como essa mesma fração de suspensão viral, apresentou melhores resultados para a curva de dissociação, apresentando pico único em T_m de 74,95 (média; dp= 0,95), que é próximo da T_m do controle positivo de 75,03 (media; dp= 0,29) (Tabela 4.46). Entretanto, o uso do sobrenadante impactou na sensibilidade da reação quando comparados os valores de C_q obtidos com a mesma fração extraída da cultura pura de *A. laidlawii*.

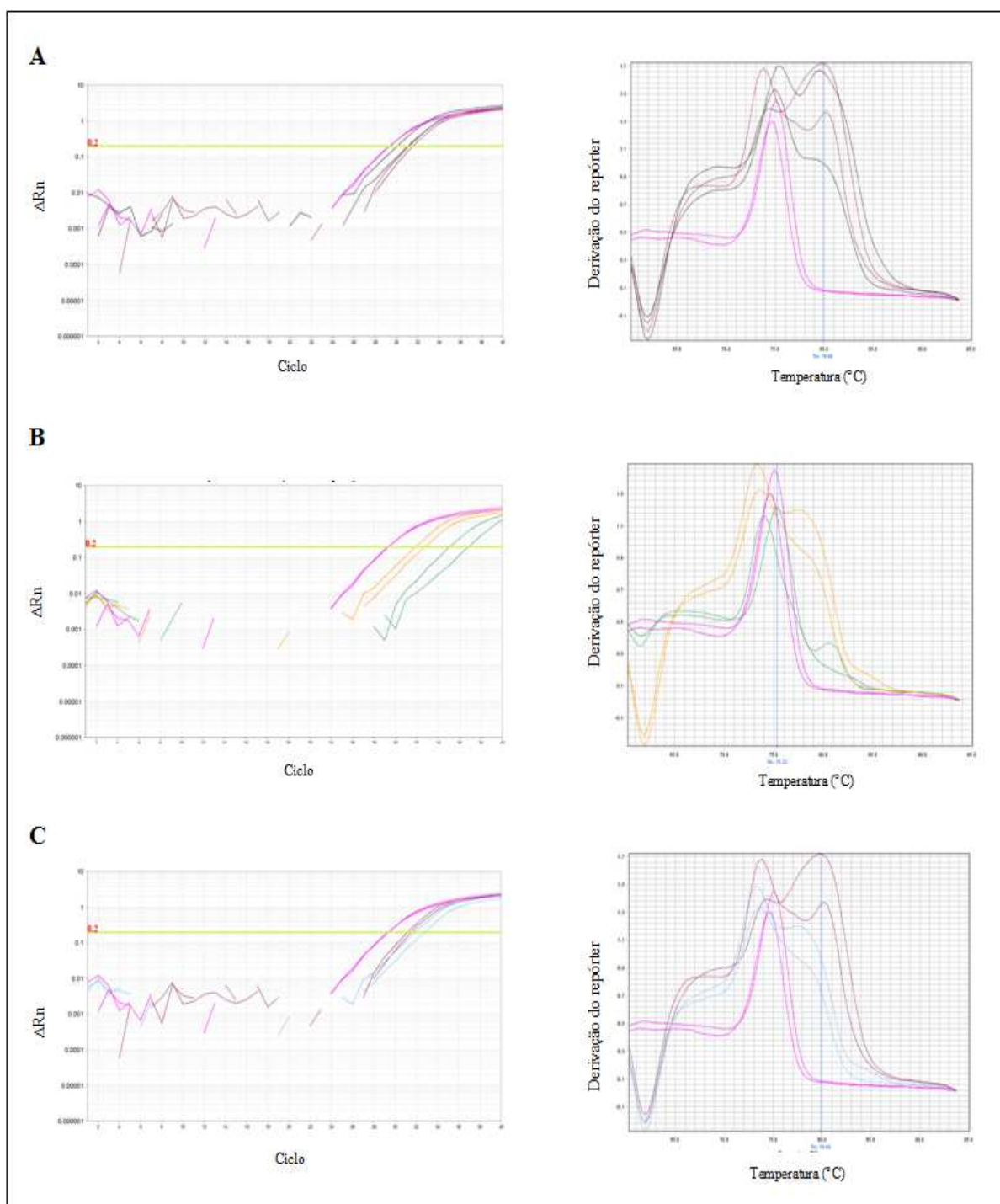


Figura 4.50: Ensaio de qPCR *in house* com 2 UFC de DNA extraído de sobrenadante e *pellet* de PAG contaminado com *A. laidlawii* através do kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega®). **A:** Amplificação de 2 UFC de *A. laidlawii* de *pellet* de PAG (em preto), DNA de *pellet* de PAG livre de contaminantes (em marrom) e 2 UFC de *pellet* de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa). **B:** Amplificação de 2 UFC de *A. laidlawii* de sobrenadante de PAG (em verde), DNA de sobrenadante de PAG livre de contaminantes (em amarelo) e 2 UFC de sobrenadante de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa). **C:** Amplificação de 2 UFC de sobrenadante de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa), e reações com DNA extraído de *pellet* (azul) e sobrenadante (marrom) de PAG sem adição de bactérias.

Tabela 4.46: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com sobrenadante e *pellet* extraídos de PAG livre de micoplasmas, PAG aditada com *A. laidlawii* e de cultura pura de *A. laidlawii* com o kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega®).

Amostra		C_q	T_m	
PAG	<i>Pellet</i>	31,84	78,37	
		30,92	78,54	
	Sobrenadante	37,40	73,13	
		39,95	61,65	
	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μ L de <i>A.laidlawii</i>)	31,07	74,99	
		30,08	75,50	
	Sobrenadante (2 UFC/ μ L de <i>A. laidlawii</i>)	36,86	73,98	
		35,05	75,33	
	Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	<i>Pellet</i> (2 UFC/ μ L)	31,32	75,33
			32,51	75,16
Sobrenadante (2 UFC/ μ L)		29,30	74,65	
		29,33	74,99	

4.7.2.4- Ensaio com os iniciadores F3R3 utilizando matriz total de PAG

Apesar do kit de extração da Promega® ter apresentado melhores resultados em comparação ao kit *Mycoseq*® (Life Technologies®) quando utilizado o sobrenadante de PAG, foi adotada a lógica anteriormente aplicada para a testagem de matriz total de suspensão viral. Amostras com os volumes de 500, 400, 300, 200, e 100 μ L de PAG, aditados com *A. laidlawii* ou livre de contaminates, foram utilizados para a extração de DNA com o kit *Mycoseq*® (Life Technologies®).

Ao contrário dos resultados obtidos com os sobrenadantes de PAG extraídos com o kit *Mycoseq*® (Life Technologies®), as amostras de matriz total, em todos os volumes, apresentaram picos bem definidos em T_m de 75,29 °C (média; dp= 0,85) quando aditados com *A. laidlawii*. Em contrapartida, as reações referentes à matriz total não aditada apresentaram picos inespecíficos, que podem facilmente ser diferenciados de picos gerados quando a amostra está contaminada (Figura 4.51).

Da mesma forma como ocorreu com suspensão viral, não foi possível estabelecer o melhor volume de matriz total, uma vez que em cada volume foi aditado uma quantidade de UFC de *A. laidlawii* diferente: 10 UFC para cada 100 μL de amostra. Porém, avaliando os C_q de amplificação das amostras contaminadas, foi observado que a matriz total possui efeito de inibição na detecção de *A. laidlawii*, uma vez que o aumento de DNA bacteriano testado não foi acompanhado pela diminuição de C_q de amplificação (Tabela 4.47 e 4.48). Ainda, não pode ser explicado o melhor resultado com 200 μL em comparação com os outros volumes.

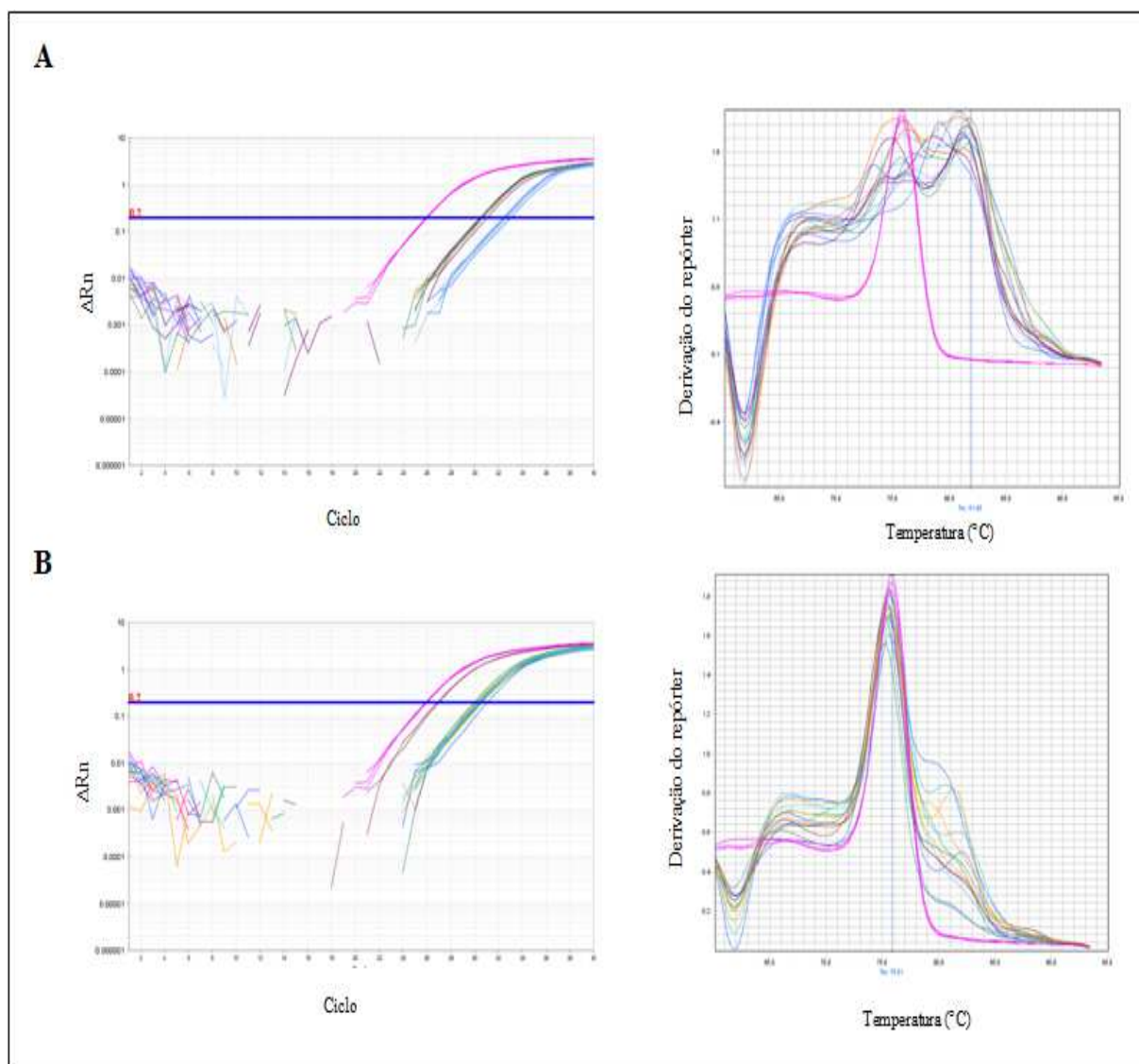


Figura 4.51: Ensaio de qPCR *in house* com F3R3 utilizando matriz total de PAG, aditada e não contaminada com cultura pura de *A. laidlawii*. **A:** Amplificação de 10 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa) e dos volumes de 500, 400, 300, 200, e 100 μL de matriz de PAG não aditada (demais cores). **B:** Amplificação de 10 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (em rosa) e dos volumes de 500, 400, 300, 200, e 100 μL de matriz de PAG aditada (demais cores).

Tabela 4.47: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com DNA extraído de 500 -100 μ L de: matriz total de PAG aditada com 10 UFC de *A. laidlawii* e de PAG livre de micoplasmas.

Volume de PAG	C_q	T_m	C_q	T_m
	Aditada (10 UFC/ 100 μ L)		Livre de contaminantes	
500 μ L	30,44	75,64	32,57	66,24
	30,32	75,81	32,35	75,98
	30,42	75,64	32,69	81,85
400 μ L	30,29	75,64	33,00	81,18
	31,09	75,64	32,70	80,84
	30,31	75,47	32,53	79,17
300 μ L	30,60	75,14	30,70	81,68
	30,00	75,64	30,49	81,68
	30,48	75,14	30,50	75,98
200 μ L	26,90	75,31	31,05	78,66
	27,02	75,47	30,48	81,52
	27,83	72,28	30,54	81,35
100 μ L	29,95	75,47	31,49	75,81
	30,69	75,64	30,74	76,31
	30,21	75,47	30,63	80,84

Tabela 4.48: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com DNA extraído de 10 UFC de *A. laidlawii*.

Amostra	C_q	T_m	
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i>	25,89	75,81	
	10 UFC	26,02	75,81
	25,92	75,81	

Para definir o melhor volume de amostra, considerando que o kit *Mycoseq*[®] (Life Technologies[®]) possui o limite de 100 μ L de amostra para a extração de DNA, mas que em contrapartida, o uso de uma maior quantidade de amostra aumenta a chance de detecção de *A. laidlawii*, foram escolhidos os volumes de 500, 200 e 100 μ L de matriz total de PAG, aditados com a mesma quantidade de UFC e não aditados, para a extração de DNA e amplificação por qPCR *in house* (Tabela 4.49) (Figura 4.52).

As curvas de dissociação de todos os volumes testados apresentam um pico bem definido com T_m de 75,25 °C (média; dp= 0,09), em comparação com a T_m de cultura pura de *A. laidlawii* de 75,37 °C (média; dp= 0,39). De acordo com os valores de C_q descritos na tabela 4.49, foi possível verificar que os melhores volumes para a detecção de *A. laidlawii* foram de 200 e 100 μ L.

Avaliando os resultados dos iniciadores F3R3 frente à detecção de *A. laidlawii* por qPCR em PAG de vacina de Febre Amarela, foi possível observar que o uso de matriz total gerou melhores resultados quanto à análise de C_q e curva de dissociação quando comparada com *pellet* ou sobrenadante.

Resta ainda estabelecer se a utilização de matriz total é adequada para os outros conjuntos de iniciadores da qPCR *in house* (e qual o seu melhor volume para que possa ser adotado na rotina para a extração), e baseado nisso, determinar o LD (em número de cópias de DNA e em UFC) de cada um dos quatro pares de oligonucleotídeos da qPCR *in house* nas amostras de PAG.

Tabela 4.49: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com DNA extraído de 500, 200 e 100 μ L de: matriz total de PAG aditada com 2 UFC de *A. laidlawii*, de PAG livre de micoplasmas e de cultura pura de *A. laidlawii*.

Amostra	C_q	T_m	
PAG (matriz total)	500 μ L	32,93	77,65
		31,98	79,70
		32,32	75,94
	200 μ L	31,07	76,96
		31,10	74,23
		30,85	81,41
	100 μ L	31,07	76,62
		31,06	76,45
		30,97	81,07
PAG (matriz total) aditada com 10 UFC	500 μ L	33,71	75,25
		33,53	75,08
		32,99	75,25
	200 μ L	29,63	75,25
		29,34	75,25
		29,38	75,25
	100 μ L	30,50	75,42
		31,12	75,25
		30,50	75,25
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i> (matriz total)	10 UFC	29,64	75,60
		30,40	74,91
		29,84	75,60

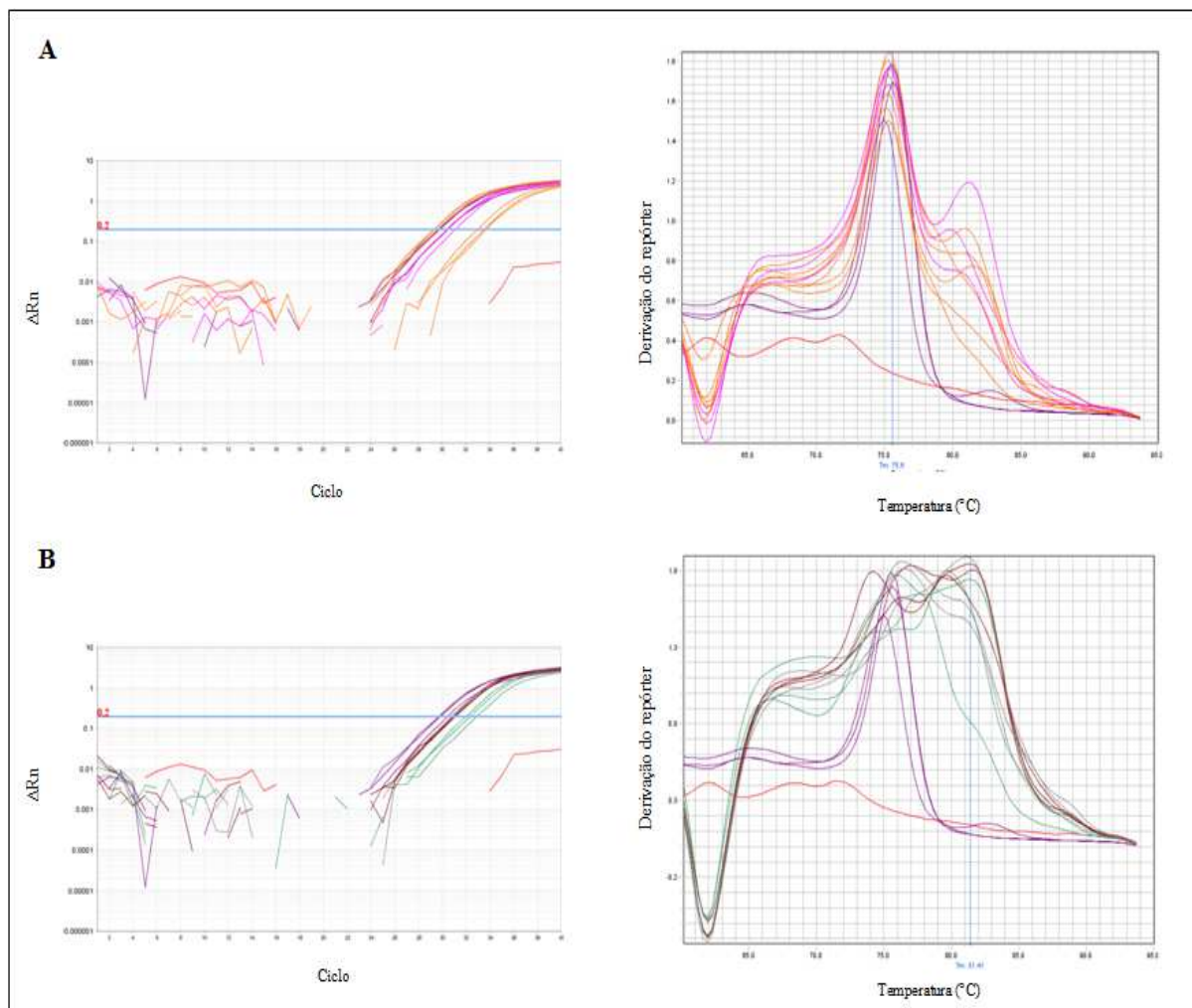


Figura 4.52: Ensaio de qPCR *in house* com F3R3 utilizando 2 UFC de DNA extraído de 500, 200 e 100 μ L de matriz total de PAG contaminada com *A. laidlawii*. A: Curvas de amplificação e de dissociação da cultura pura de *A. laidlawii* (em roxo) e das amostras de suspensão viral aditadas com esta bactéria (demais cores). **B:** Curvas de amplificação e de dissociação da cultura pura de *A. laidlawii* (em em roxo) e das amostras de suspensão viral livre de contaminates (demais cores).

4.7.3- Soro Fetal Bovino

O soro fetal bovino é um os insumos utilizados no CQ de Bio-Manguinhos que necessita ser avaliado quanto à presença de contaminantes conforme discutido anteriormente.

Um estudo preliminar foi realizado para avaliar a interferência da matriz desse insumo nos ensaios de qPCR *in house*, utilizando como amostra o *pellet* obtido após centrifugação, obedecendo o protocolo padrão de detecção de *Mycoplasma sp.* e *A. laidlawii* utilizado na SETBI.

De acordo com a figura 4.53, foi possível observar o efeito inibidor do *pellet* de soro fetal bovino contaminado com 5 UFC de *A. laidlawii* (em relação ao valor de C_q encontrado-

média= 34,05; dp= 0,84) em comparação com o obtido nas reações com 5 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (média= 27,16; dp= 0,12) (Tabela 4.50). Entretanto, não houve interferência da amostra contaminada em relação à curva de dissociação, apresentando pico único em T_m 74,79 °C (média; dp= 0,2), cujo valor é próximo da cultura pura (média= 75,31; dp= 0,36). Além disso, a amostra sem contaminação, de acordo com análise de C_q e curva de dissociação, não apresentou amplificação, e os picos formados foram típicos de dímeros de iniciador.

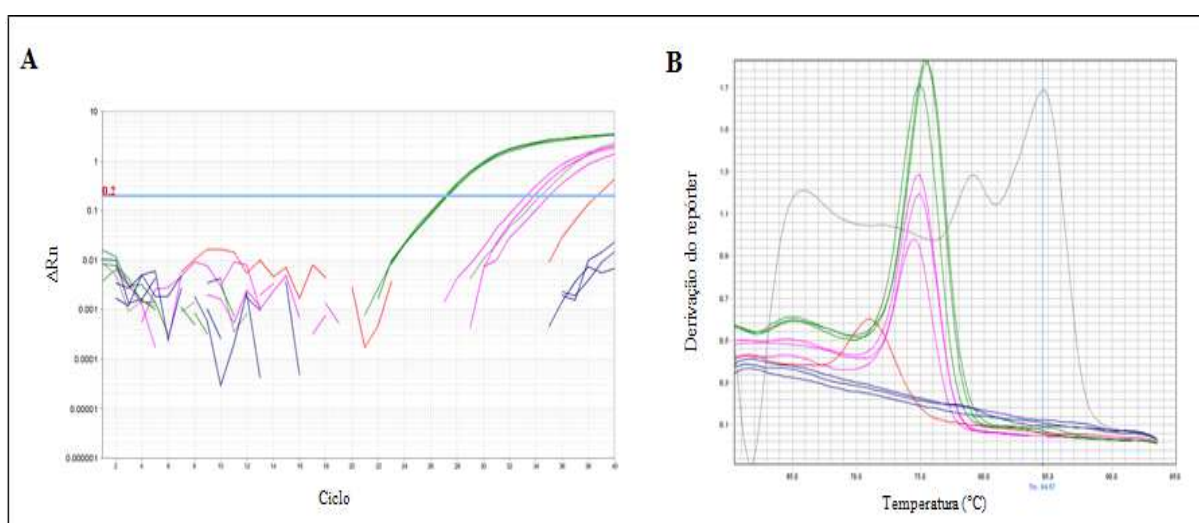


Figura 4.53: Ensaio de qPCR *in house* com F3R3 utilizando 5 UFC de DNA extraído de *pellet* de soro fetal bovino contaminado com *A. laidlawii*. (Da esquerda para a direita) **A** e **B**: Curvas de amplificação e dissociação de *pellet* de soro fetal bovino contaminado com 5 UFC de *A. laidlawii* (em rosa), de 5 UFC de cultura pura de *A. laidlawii* (em verde) e de *pellet* de soro fetal bovino livre de contaminação (em azul). Controle negativo de qPCR em vermelho.

Tabela 4.50: Valores de C_q e T_m obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com DNA extraído de *pellet* de cultura pura de *A. laidlawii*, de soro fetal bovino contaminado e de soro fetal bovino livre de micoplasmas.

Amostra	C_q	T_m
Soro fetal bovino (<i>pellet</i>)	-	61,73
	-	61,38
	-	61,73
Soro fetal bovino aditado com 5 UFC de <i>A. laidlawii</i> (<i>pellet</i>)	35,00	74,55
	33,88	74,90
	33,27	74,90
Cultura pura de <i>A. laidlawii</i> (<i>pellet</i>)	27,28	74,90
	27,03	75,43
	27,17	75,61

Como o soro fetal bovino é um suplemento rico em macromoléculas como proteínas, estas poderiam ter um papel importante na inibição da reação de qPCR (Gstraunthaler, 2003; Bustin & Nolan, 2003; Bustin, 2005). Assim, futuramente deve ser avaliado um protocolo para eliminação dessa inibição envolvendo o uso de matriz total (ao invés de *pellet*, assim como no caso de suspensão viral e PAG da VFA), diluição da matriz ou novo kit de extração de DNA que possa conferir um maior grau de pureza no DNA da amostra.

5- CONCLUSÃO

Foi desenvolvida uma metodologia de qPCR *in house* para a detecção das espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* preconizadas pela FE 7.0 através da prospecção de quatro conjuntos de iniciadores que amplificam a região 16S rDNA desses microrganismos.

Através das análises *in silico* e *in vitro*, os iniciadores da qPCR *in house* demonstraram ser específicos para a detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, não amplificando os gêneros filogeneticamente próximos *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Clostridium* atendendo às exigências da FE 7.0.

De acordo com os testes de exclusividade, os iniciadores prospectados detectaram com eficiência adequada somente as espécies de *Mycoplasma* sp. ou *A. laidlawii* para o grupo ao qual foram designados.

Além das sete espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* exigidas pela FE 7.0, a avaliação *in silico* (BLASTn[®] -NCBI[®]) dos quatro conjuntos de iniciadores prospectados revelou a possibilidade da detecção de pelo menos quarenta espécies de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii* pela metodologia de qPCR *in house*, com similaridade entre os oligonucleotídeos e a região 16S rRNA de 94 a 100%.

O LD da qPCR *in house* foi de 10 cópias de DNA de *Mycoplasma* sp. exceto *A. laidlawii*, cujo LD foi de 1 cópia, mantendo-se a eficiência e linearidade da reação. Ainda, não foi possível o estabelecimento deste parâmetro para *M. hyorhinis* devido à dificuldade de cultivo para a obtenção de material necessário aos ensaios *in vitro*.

A qPCR *in house* se mostrou equivalente ao kit comercial MycoSEQ[®] (Life Technologies[®]) e superior à PCR convencional multiplex quanto à detecção das espécies de *M. orale*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pneumoniae* e *A. laidlawii*.

Os resultados obtidos nos ensaios de qPCR *in house* com o *pellet* de suspensão viral e PAG permitem afirmar que existe interferência, tanto de inibição por análise de C_q quanto na curva de dissociação, quando testado DNA extraído de *pellet* contaminado. Em contrapartida com o sobrenadante, apesar dos melhores resultados na curva de dissociação, a sensibilidade de detecção é menor. A matriz total de suspensão viral e PAG apresentaram os melhores

resultados, tanto em sensibilidade quanto em análise da curva de dissociação, nas reações de qPCR *in house*. Entretanto, o volume ideal para a extração de DNA não pode ser estabelecido a tempo.

A matriz de soro fetal bovino apresentou efeito de inibição na detecção de *A. laidlawii* por qPCR *in house*, sendo necessários ensaios de otimização futuros para a eliminação desta interferência.

O kit de extração *Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System* (Promega[®]) apresentou melhores resultados nos ensaios de qPCR *in house* com o sobrenadante de suspensão viral e PAG, em relação à análise da curva de dissociação, em comparação com o kit *PrepSEQ[™] Nucleic Acid Extraction Kit* (Life Technologies[®]). Não houve diferença entre os kits quando testado o *pellet* de suspensão viral e PAG.

A metodologia de qPCR desenvolvida *in house* demonstrou ser específica para a detecção de *Mycoplasma* sp. e *A. laidlawii*, assim como o kit *Mycoseq[®]* (Life Technologies[®]), de acordo com o fabricante. Além disso, possui o mesmo LD certificado pelo kit comercial, exceto em relação à *A. laidlawii*, cujo LD pela qPCR *in house* é superior.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5Prime Corporation. Estados Unidos da América, 2015. [capturado em 13 mar 2015]. Disponível em: http://www.5prime.com/media/371831/perfecttaq%20dna%20polymerase%20manual_5prime_1064561_122010.pdf

AppliedBiosystems. Primer Express Software. Estados Unidos da América, 2015. [capturado em 13 mar 2015]. Disponível em: <http://primer-express.software.informer.com/>

Ahmed, FE. **Quantitative Real-time RT-PCR: Application to Carcinogenesis.** Cancer Genomics & Proteomics, 2005; 2: 317-32.

Akane A; Matsubara K; Nakamura H; Takahashi S; Kimura K. **Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification.** J Forensic Sci, 1994; 39 (2): 362-72.

Allam, NM & Lemcke RM. **Mycoplasmas isolated from the respiratory tract of horses.** J. Hyg., Camb. 1975; 74, 385.

Al-Soud, AW; Jönsson, LJ; Rådström, P. **Identification and Characterization of Immunoglobulin G in Blood as a Major Inhibitor of Diagnostic PCR.** J Clin Microbiol, 2000; 38 (1): 345–50.

Anderson RM, Crombie JA, Grenfell BT. **The epidemiology of mumps in the UK: a preliminary study of virus transmission, herd immunity and the potential impact of immunization.** Epidemiol Infect, 1987; 99 (1): 65-84.

Arai, S., R. Harasawa, T. Ohno, M. Takeuchi, K. Hikizi, N. Kobayashi, I. Lee, K. Kato, H. Takahashi, I. Okamoto, and T. Furudera. 1994. **Comparative studies to detect mycoplasma contamination in bioindustrial materials, for validating standard method.** Int. Organ. Mycoplasma. Lett. 3: 48-49.

Benchimol, JL [online]. **Febre amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada**[capturado em 02 mar. 2014]. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/4nktq/pdf/benchimol-9788575413951-05.pdf>

Bio-Manguinhos [online]. **Bio-Manguinhos/Fiocruz**. Rio de Janeiro, Brasil; c2014b. [capturado em 16 mar 2014]. Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=59&Itemid=72

Bio-Manguinhos [online]. **Bio-Manguinhos/Fiocruz**. Rio de Janeiro, Brasil; [capturado em 08 jul. 2013]. Disponível em <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/vacinas/virais/febre-amarela>

Bio-Manguinhos [online]. **Bio-Manguinhos/Fiocruz**. Rio de Janeiro, Brasil, c2013a; [capturado em 08 jul. 2013]. Disponível em <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/home/quem-somos>

Bio-Manguinhos [online]. **Bio-Manguinhos/Fiocruz**. Rio de Janeiro, Brasil, c2013b; [capturado em 08 jul. 2013]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/vacinas/virais/triplice-viral>

Bio-Manguinhos [online]. **Bio-Manguinhos/Fiocruz**. Rio de Janeiro, Brasilc2013c; [capturado em 08 jul. 2013]. Disponível em: www.bio.fiocruz.br/index/sarampo-sintomas-transmissao-e-prevencao

Bio-Manguinhos [online]. **Bio-Manguinhos/Fiocruz**. Rio de Janeiro, Brasil, c2013d; [capturado em 08 jul. 2013]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/rubeola-sintomas-transmissao-e-prevencao>

Bio-Manguinhos [online]. **Bio-Manguinhos/Fiocruz**. Rio de Janeiro, Brasil, c2013e; [capturado em 08 jul. 2013]. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/caxumba-sintomas-transmissao-e-prevencao>

Blanchard, A; Gautier, M; Mayau, V.**Detection and identification of mycoplasmas by amplification of rDNA**.FEMS Microbiol. Lett, 1990; 81: 37-42.

Bölske, G. 1988. **Survey of mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods**. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. 269: 331-340. 4.

Buim, M, Mettifogo E, Timenetsky J, Kleven S, Ferreira A. **Epidemiological survey on Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae by multiplex PCR in commercial poultry.** Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, 2009; 29 (7): 552-56.

Bóve, JM. **Molecular features of mollicutes.** Clin Infect Dis., 1993; Suppl 1:S10-31.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003a. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jun.2003; Seção 1.

Brasil. Ministério da Saúde. **RDC nº 210. Publica Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos.** Brasília, 2003b. Diário Oficial da União, 04 de Agosto de 2003.

Brasil [online]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cartilha de Vacinas.** [capturado em 08 de jul 2013]. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c0dee80474580598c59dc3fbc4c6735/cart_vac.pdf?MOD=AJPERES

Brasil [online]. Ministério da Saúde. **PNI: Programa Nacional de Imunizações, 25 anos**[online]. Brasília; 1998. [capturado em 03 mar. 2014]. Disponível em: http://www.fef.br/biblioteca/arquivos/data/Programa_nacional_de_imunizacoes.pdf.

Brasil [online] Ministério da Saúde. **Manual de vigilância epidemiológica de febre amarela (online).** Brasília; 2004. [capturado em 02 mar. 2014] Disponível em: http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epid_febre_amarela.pdf

Brasil [online]. Ministério da Saúde. **Sistema de Vigilância Epidemiológica** [online]. Brasília, c2014a; [capturado em 06 mai. 2014]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/marco/20/Grafico-sarampo.pdf>

Brasil [online]. Ministério da Saúde. **Sistema de Vigilância Epidemiológica** [online]. Brasília, c2014b; [capturado em 06 mai. 2014]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/Estrat--gias-de-controle-e-incidencia-anual-da-rub--ola.pdf>

Brasil [online]. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica** [online]. Brasília, 2005; [capturado em 23 abr. 2015]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3463ca004745920f9a61de3fbc4c6735/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf?MOD=AJPERES

Brasil [online]. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica- Febre Amarela- 7ª edição**. Brasília, 2009; [capturado em 08 jul. 2013]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_febre_amarela.pdf

Brasil [online]. Ministério da Saúde. **Febre Amarela- Histórico**. Brasília, c2014c. [capturado em 03 mar. 2014]. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/historico.php>

Brasil [online]. Ministério da Saúde. **Febre Amarela- Profissionais de Saúde**. Brasília; c2014d [capturado em 03 mar. 2014]. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/febreamarela/profissionais.php>

Brown, DR; Whitcomb, RF; Bradbury, JM. **Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes)**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007; 57: 2703–19.

Burn, SF. **Detection of β -galactosidase activity: X-gal staining**. Methods Mol Biol, 2012; 886: 241-50.

Burns, M; Valdivia, H. **Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR**. Eur Food Res Technol, 2008; 226:1513–24.

Bustin, SA. **Real-time, fluorescence-based quantitative PCR: a snapshot of current procedures and preferences**. Expert Rev. Mol. Diagn, 2005; 5, 493–498.

Bustin SA, Nolan T. **Pitfalls of quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction**. J Biomol Tech 2004; 15: 155–166.

Bustin, SA; Benes, V; Garson, JA; Hellemans, J; Huggett, J; Kubista, M; Mueller, R; Nolan, T; Pfaffl, MW; Shipley, GL; Vandesompele, J; Wittwer, CT. **The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments**. Clinical Chemistry, 2009; 55: 4.

Caraguel, CGB; Stryhn, h; Gagne, N; Dohoo, IR; Hammell, KL. **Selection of a cutoff value for real-time polymerase chain reaction results to fit a diagnostic purpose: analytical and epidemiologic approaches**. J Vet Diagn Invest, 2011; 23: 2–15.

Centro de Vacinação de Adultos [online]. Vacinas contra sarampo, rubéola e caxumba. Rio de Janeiro, Brasil; 2006. [capturado em 10 mar. 2014]. Disponível em: <http://www.cva.ufrj.br/informacao/vacinas/mmr-v.html>.

Centro de Vigilância Epidemiológica [online]. **Informe Técnico Vacina contra Febre Amarela**. São Paulo, Brasil; 2011. (capturado 02 mar. 2014). Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/imuni/pdf/IF11_VAC_FAMARELA.pdf

Chalker, VJ; Brownlie, J. **Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergeneric spacer region sequence comparison**. Int J Syst Evol Microbiol, 2004; 54, 537–42.

Chandler DKF, Volokhov DV, Chizhikov, VE. **Historical Overview of Mycoplasma Testing for Production of Biologics**. American Pharmaceutical Rev. 2011 Mai/ Jun; 14.

Chingbingyong MI, Hughes CV. **Detection of Mycoplasma fermentans in human saliva with a polymerase chain reaction-based assay**. Archs Oral Biol, 1996; 41:311-4.

Csako G. **Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing**. Clin Chim Acta, 2006; 363: 6–31.

Deutschmann, SM; Kavermann, H; Knack, Y. **Validation of a NAT-based Mycoplasma assay according European Pharmacopoeia**. Biologicals, 2010; 38: 238–48.

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

Elnifro, EM; Ashshi, AM; Cooper, RJ; Klapper, PE. **Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology**. Clin Microbiol Rev., 2000; 13(4): 559–70.

Falah, M; Gupta, RS. **Phylogenetic analysis of mycoplasmas based on Hsp70 sequences: cloning of the dnaK (hsp70) gene region of Mycoplasma capricolum**. Int. J. Syst. Bacteriol, 1997; 47:38–45.

Farmacopeia Americana. **Validation of Compendial Methods**. In: US PHARMACOPEIA 24. Rockville, 1999; 1225.

Farmacopeia Brasileira 5ª ed. Brasília, Brasil, 2010.

Farmacopeia Européia 7.0. **Mycoplasmas**. In: European Pharmacopoeia. Strasbourg, Europa, 2010; 156-61.

Ferreira, LR. **Deteção de micoplasmas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Produtos Intermediários da Vacina contra Febre Amarela Produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz** [dissertação]. Rio de Janeiro, 2005.

Fundação Oswaldo Cruz [online]. **O sarampo**. Rio de Janeiro, Brasil; c2014. [capturado em 05 mar. 2014]. Disponível em: <http://portal.fiocruz.br/pt-br/node/4181>

Gstraunthaler, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX*, 2003; 20 (4):275-81.

Gershon AA & Krugman S. **Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and Chlamidial Infections**. American Public Health Association, 1979; 5: 665-93.

Goltz JP, Rosendal S, McCraw BM, Ruhnke HL. **Experimental studies on the pathogenicity of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* for the respiratory tract of goat**. Canadian Journal of Veterinary Research, 1986; 50: 59–67.

Gopalkrishna, V; Verma, H; Kumbhar, NS; Tomar, RS; Patil PR. **Detection of *Mycoplasma* species in cell culture by PCR and RFLP based method: Effect of BM-cyclin to cure infections**. Indian Journal of Medical Microbiology, 2007; 25 (4): 364 - 8.

Gourlay, RN; Wyld, SG; Leach, RH. ***Mycoplasma suis*, a New Species from the Intestinal and Urogenital Tracts of Pigs**. International Journal of Systematic Bacteriology, 1978; 289-292.

Gundersen, DE; Lee, IM; Schaff, DA; Harrison, NA; Chang, CJ; Davis, RE; Kingsbury, DT. **Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas)**. Int J Syst Bacteriol, 1996; 46: 64–75.

Harasawa, R; Hotzel, H; Sachse, K. **Comparison of the 16S–23S rRNA intergenic spacer regions among strains of the *Mycoplasma mycoides* cluster and reassessment of the taxonomic position of *Mycoplasma* sp. bovine group7**. Int J Syst Evol Microbiol, 2000; 50: 1325–9.

Hope-Simpson, RE. **Infectiousness of communicable diseases in the household (measles, chickenpox, and mumps)**. Lancet, 1995; 2: 549-54.

Hovi, T; Vaheri, A. **Infectivity and some physicochemical characteristics of rubella vírus ribonucleic acid**. Virology, 1970; 42 (1): 1-8.

Hou, Y; Zhang , H; Miranda, L; Lin, S **Serious Overestimation in Quantitative PCR by Circular (Supercoiled) Plasmid Standard: Microalgal pcna as the Model Gene.** PLoS ONE, 2010; 5(3): e9545.

Hu M, Buck C, Jacobs D, Paulino G, Khouri H. **Application of PCR for detection and identification of mycoplasma contamination in virus stocks.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995; 31: 710-71.

Huang S, Li JY, Wu J, Meng L, Shou CC. **Mycoplasma infections and different human carcinomas.** *World J Gastroenterol*, 2001; 7: 266–69.

Huggett, JF; Novak, T; Garson, JA; Green, C; Morris-Jones, SD; Miller, RF; Zumla, A. **Differential susceptibility of PCR reactions to inhibitors: an important and unrecognised phenomenon.** *BMC Res Notes*. 2008; 1: 70.

Hsiu-Shuei, C; Chiu-Wen, S, Shih-Rong, W. **Effect of storage conditions on detection of mycoplasma in biopharmaceutical products.** *In Vitro Cell Des. Biol. Animal* 2007; 43:113–9.

Invitrogen [online]. **Real-time PCR: From Theory to Practice** [capturado em 16 fev de 2015]. Disponível em: http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/intranet/staffpg/support/genomics_new/real-time_pcr/qpcr_handbook.pdf

Kamla, V; B, Henrich; Hadding U. **Phylogeny based on elongation factor Tu reflects the phenotypic features of mycoplasmas better than that based on 16S rRNA.** *Gene*, 1996; 171:83–7.

Katseni VL, Gilroy CB, Ryait BK, Ariyoshi K, Bieniasz PB, Weber JN, et al.. **Mycoplasma fermentans in individuals seropositive and seronegative for HIV-1.** *Lancet*, 1993; 34: 271-3.

Kobisch, M & Friis, NF. **Swine mycoplasmoses.** *Rev Sci Tech*, 1996; 15: 569–1605.

Koch, WH. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature Rev Drug Discovery*, 2004; 3, 749-61.

Kong, H; Volokhov, DV; George J; Ikonomi P; Chandler, D; Anderson, C; Chizhikov, V. **Application of cell culture enrichment for improving the sensitivity of mycoplasma detection methods based on nucleic acid amplification technology (NAT).** *Appl Microbiol Biotechnol*, 200; . 77: 223–32.

Kubista M ; Andrade JM; Bengtsson M; Forootan A; Jonák J; Lind K; Sindelka R; Sjöback R; Sjögreen B; Strömbom L; Ståhlberg A; Zoric N. **The real-time polymerase chain reaction.** *Molecular Aspects of Medicine*, 2006; 27: 95–125.

van Kuppeveld, FJM; van der Logt, JTM; Angulo, AF; van Zoest, MJ; Quint, WGV; Niesters, HGM; Galama, JMD; Melchers, WJG. **Genus- and Species-Specific Identification of Mycoplasmas by 16S rRNA Amplification.** *Applied and Environmental Microbiology*, 1992; 2606-15.

Life Technologies Corporation [online]. **MycoSEQ™ Mycoplasma Detection Assay.** Estados Unidos da América, 2010. [capturado em 04 jun. 2015]. Disponível em: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_055169.pdf

Life Technologies Corporation [online]. **Real-time PCR Handbook.** Estados Unidos da América, 2012. [capturado em 16 mar. 2014]. Disponível em: <http://find.lifetechnologies.com/qpcr/qpcrhandbook/ltfurl-lp/qpcr-handbook-2402CK-4086KY.html>

Life Technologies Corporation [online]. Estados Unidos da América, 2015a. [capturado em 12 mar. 2015]. Disponível em: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4385610>

Life Technologies Corporation [online]. Estados Unidos da América, 2015b. [capturado em 12 mar. 2015]. Disponível em: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_046776.pdf

Life Technologies Corporation [online]. Estados Unidos da América, 2015c. [capturado em 12 mar. 2015]. Disponível em: <https://www.lifetechnologies.com/br/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/technical-resources-for-oligonucleotides/protocols-for-oligonucleotides.html>

Lind K, Ståhlberg A, Zoric N, Kubista M. **Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis.** *BioTechniques*, 2006; 40:315-9.

Maniloff, J. **Mycoplasma phylogeny: correlation with molecular biological and paleontological changes.** In Abstracts of the 8th IUMS International Congress of Bacteriology, 1996; p. 8

Matsuki, T; Watanabe, K; Fujimoto, J; Takada, T; Tanaka, R. **Use of 16S rRNA Gene-Targeted Group-Specific Primers for Real-Time PCR Analysis of Predominant Bacteria in Human Feces.** Appl Environ Microbiol, 2004; 70 (12): 7220–8.

McGarrity, G.J; Kotani, H; Butler, GH. **Mycoplasmas and tissue culture cells.** In **Mycoplasmas.** Molecular biology and pathogenesis, 1992; 445-54.

Marijke Raymaekers, Rita Smets, Brigitte Maes, and Reinoud Cartuyvels. **Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays.** Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2009; 23:145–151.

Meyer MB. **An epidemiologic study of mumps: its spread in school families.** Am J Hyg, 1962; 75: 259- 81.

Mitsuhashi, M. **Basic requirements for designing optimal oligonucleotide probe sequences.** J Clin Lab Anal, 1996; 10:277–84.

Murray RGE, Breener, DJ, Bryant MP, Holt JG, Moulder JW, Pfennig N, Sneath PHA, Staley JT. **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1984; 1: 721.

Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett ADT. **Phylogenetic and Evolutionary Relationships along yellow fever virus isolates in Africa.** J Virol 2001; 85:6999-7008.

National Center for Biotechnology Information. **Basic Local Alignment Search Tool (Blast®).** USA. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

National Center for Biotechnology Information- NCBI®. **GenBank®.** Estados Unidos da América, [capturado em 16 mar. 2014]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Neimark, H. **Phylogenetic relationships between mycoplasmas and other prokaryotes.** The Mycoplasmas, 1979; 1: 43–61.

Netto, C; Soccol, VT; Sepulveda, LM; Timenetsky, J. **Experimental infection of BHK21 and Vero cell lines with different Mycoplasma spp.** Braz. J. Microbiol., 2014; 45 (4): 1513-19.

New England Biolabs[®]. Estados Unidos da América, [capturado em 16 mar. 2014]. Disponível em: <https://www.neb.com/applications/dna-amplification-and-pcr>

Noelle RJ, Marshall L, Roy M, Shepherd DM, Stamenkovic I, et al.. **Role of contact and soluble factors in the growth and differentiation of B cells by helper T cells.** *Immune-Mediated Diseases: From Theory to Therapy*, 1992; 323: 131–38.

Nokes DJ, Wright J, Morgan-Capner P, Anderson RM. **Serological study of the epidemiology of mumps virus infection in north-west England.** *Epidemiol Infect*, 1990; 105 (1): 175-95.

Norrby E. **Measles.** *J Virology*, 1985; 1305- 21.

Nolan T; Hands RE; Ogunkolade BW; Bustin SA. **SPUD: a qPCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations.** *Anal Biochem*, 2006; 351: 308–10.

Nutz, S; Döll, K; Karlovsky, P. **Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*.** *Anal Bioanal Chem*, 2011; 401:717–26.

Okasaki K, Tanabayashi K, Takeuchi K, et al.. **Molecular cloning and sequence analyses of The mumps virus gene encoding the L protein and the trailer sequence.** *Virology*, 1992; 188 (2): 926-30.

Organização Mundial da Saúde [online] **OMS: Mortes por sarampo caem 71%, mas surtos em algumas regiões comprometem progresso.** c2014.[capturado em 03 mar 2014]. Disponível em: <http://www.onu.org.br/oms-mortes-por-sarampo-caem-71-mas-surtos-em-algumas-regioes-comprometem-progresso/>

Pan, S; Gu, B; Wang, H; Yan, Z; Wang, P; Pei, H; Xie, W; Chen, D; Liu, G. **Comparison of four DNA extraction methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis* by real-time PCR and its clinical application in pulmonary tuberculosis.** *J Thorac Dis*, 2013; 5 (3): 251-7.

Pettersson, B; Tully, JG; Bölske, G; Johansson, KE. **Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg et al.. 1989) based on 16S rDNA sequences.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000; 50: 291–301.

Pfaffl MW. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** Nucleic Acids Res, 2001; 29: 45.

Pfaffl, MW. **A-Z of Quantitative PCR.** IUL Press, 2004; 87-112.

Pfützner, H & Sachse, K. **Mycoplasma bovis as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle.** RevSciTech of Int Epiz, 1996; 15 (4), 1477-1494.

Plotkin, SA; Orenstein, WA; Offit, PA. **Vaccines.** 6th edition. Estados Unidos da América: Elsevier Saunders; 2012.

PREMIER Biosoft Corporation [online]. **PCR Primer Design Guidelines.** Estados Unidos da América, 1994 [capturado em 07 de jul de 2015]. Disponível em: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html

Raymakers C, RuijterJM, Deprez RHL, Moorman AFM. **Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data.** Neuros Letters, 2003; 339: 62–66.

Rawadi, G; Lecaque, D; Pirot, D; Roman-Roman, S. **Detection and identification of mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction.** Methods Mol. Cell. Biol, 1993; 4: 147-56.

Rawadi, G & Dussurget, O. **Advances in PCR-based detection of Mycoplasmas contaminating cell cultures.** PCR Methods Appl 1995; 4 :199-208.

Raymaekers M, Smets R, Maes B, Cartuyvels R. **Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays.** Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2009; 23: 145–51.

Razin, S. **The genus *Mycoplasma* and related genera (Class *Mollicutes*).** Procaryotes, 2006; 4: 836–904.

Razin S, Yogevev D, Naot Y. **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.** Microbiol Mol Biol Ver, 1998; 62: 1094–156.

Rebrikov DV, Trofimov DY. **Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis.** Applied Biochemistry and Microbiology, 2006; 42 (5): 455–63.

Ribani, M.; Bottoli, C.; Collins, C.; Jardim, I.; Melo, L. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, 2004; 27 (5): 771-80.

Rinttilä, T; Kassinen, A; Malinen, E; Krogius, L; Palva, A. **Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR.** J of App Micro, 2004; 97: 1166–77.

Riveira, A; Munguia, R; Chavez, E; Sánchez, J. A; Santamaria, S.; Giono S. **DNA Depletion by clinical isolated mycoplasmas, México.** Rev Costarr Salud Pública, 2013; 22: 144-48.

Roulland-Dussoix, D; Henry, A; Lemercier. B. **Detection of mycoplasmas in cell cultures by PCR: A one year study.** J. Microbiol. Methods, 1994; 19: 127-34.

Rumsby G. **An introduction to PCR techniques.** Methods of Molecular Biology, 2006; 324: 75-89.

Rychlik W, Rhoads RE. **A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and invitro amplification of DNA.** Nucleic Acids Res, 1989; 17: 8543–51.

Sigma Aldrich Corporation. Estados Unidos da América, 2015. [capturado em 18 mar 2015]. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/SAJ/Brochure/1/j_qpcr_techguide06.pdf

Saiki RK. **The design and optimization of the PCR.** New York: Stockton Press; 1989; 7–22.

Saunders, G; Parkes, H. **Analytical molecular biology: quality and validation.** RSC, Cambridge, pp 1–72.

SantaLucia J Jr. **A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics.** Proc Natl Acad Sci, 1998; 95:1460-65.

Spaepen, M; Angulo, AF; Marynen, P; Cassiman, JP. **Detection of bacterial and mycoplasmal contamination in cell cultures by polymerase chain reaction.** FEMS Microbiol. Lett, 1992; 99: 89-94.

Schaefferbeke T, Gilroy CB, Béb ar C, Dehais J, Taylor-Robinson D. **Mycoplasma fermentans, but not M. penetrans, detected by PCR assays in synovium from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders.** J Clin Pathol, 1996; 41: 311-4.

Schneider, B; Gibb, KS; Seemuller, E. **Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas.** Microbiology, 1997; 143:3381-9.

Secretaria do Estado de S o Paulo [online]. **Alerta sarampo 2013: Casos confirmados de Sarampo no Brasil Atualiza o 5/8/2013.** S o Paulo, Brasil; 2013. [capturado em 16 mar. 2014].
Dispon vel em:
ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/RESP/2013/sarampo13_alerta_0508.pdf

Sedwich WD, Sokol F. **Nucleic acid of rubella v rus and its replication in hamster kidney cells.** J Virology, 1970; 5 (4): 478-89.

Simonsson T, Pecinka P, Kubista M. **DNA tetraplex formation in the control region of c-myc.** Nucleic Acids Res 1998; 26: 1167-1172.

Smart, CD; Schneider, B; Blomquist, CL; Guerra, LJ; Harrison, NA; Ahrens, U; Lorenz, KH; Seemuller, E; Kirkpatrick, BC. **Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region.** Appl. Environ. Microbiol, 1996; 62: 2988-93.

Spandidos A, Wang, X, Wang, H, Seed B. **PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification.** Nucleic Acids Research, 2010; 38: 792-9.

Tabatabaei-Qomi, R; Sheykh-Hasan, M; Fazaely, H; Kalhor, N; Ghiasi, M. **Development of a PCR assay to detect mycoplasma contamination in cord blood hematopoietic stem cells.** Iranian Journal of Microbiology, 2014; 6 (4): 281-4.

Tang J, Hu M, Lee S, Roblin R. **A polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture.** J Microbiol Methods 2000; 39:121-6.

Teyssou, R; Poutiers, F; Saillard, C; Grau, O; Laigret, F; Bov , JM; B b ar, C. **Detection of mollicute contamination in cell cultures by 16S rDNA amplification.** Mol Cell Probes, 1993; 7 (3):209-16.

van der Velden, VHJ; Hochhaus, A; Cazzaniga, G; Szczepanski, T; Gabert, J; van Dongen, JJM. **Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.** *Leukemia*, 2003; 17, 1013–34.

Vasconcelos PFC. **Febre amarela: reflexões sobre a doença, as perspectivas para o século XXI e o risco da reurbanização.** *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2002; 5 (2): 244-58.

Vasconcelos PFC. **Febre amarela.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003; 36(2):275-93.

Unisciense[®]. Estados Unidos da América, 2010 [capturado em 10 jul 2015]. Disponível em: <http://www.uniscience.com.br/corantes-de-acidos-nucleicos-e-produtos-para-genomica/gelred-concentrado>

Uphoff CC, Drexler HG. **Detection of mycoplasma in leukemia–lymphoma cell lines using polymerase chain reaction.** *Leukemia*, 2002; 16, 289–93.

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

Urbanek C, Goodison S, Chang M, Porvasnik S, Sakamoto N et al.. **Detection of antibodies directed at M. hyorhinis p37 in the serum of men with newly diagnosed prostate cancer.** *BMC Cancer*, 2011; 11: 233.

Wang E, Weaver SC, Shope RE, Tesh RB et al.. **Genetic variation in yellow fever virus: duplication in the 3'noncoding region of strains from Africa.** *Virology* 1996; 225: 274-81.

Wang H.; Kong F.; Jelfs P.; James G.; Gilbert G. L. **Simultaneous Detection and Identification of Common Cell Culture Contaminant and Pathogenic Mollicutes Strains by Reverse Line Blot Hybridization.** *Appl Environ Microbiology* 2004; 70(3): 1483–6.

Waterson AP. **Measles virus.** *Arch Ges Virusforsch*, 1965; 16:57-80.

Weisburg, WG; Tully, JG; Rose, DL; PetzeL, JP; Oyaizu, H; Yang, D; Mandelco, L; J. Sechrest; Lawrence, TG; Van Etten, J; Maniloff, J; Woese1, CR. **A Phylogenetic Analysis of the Mycoplasmas: Basis for Their Classification.** *J of Bact*, 1989; 6455-67.

Weisburg, WG; Barns, SM; Pelletier, DA; Lane, DJ. **16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study**. J of Bact, 1991; 697-703.

Wirth, M; Berthold, E; Grashoff, M; Pftitzner, H; Schubert, U; Hauser H. **Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction**. Cytotechnology, 1994; 16: 67-77.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221- 271.

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**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004; 54: 871-5.

WHO: World Health Organization [online]. **Requirements for yellow fever vaccine**. Geneva, Switzerland. WHO Technical Report Series, 1995; 872: annex 2: 41. Disponível em: [capturado em 13 jun. 2015]. http://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/yellow_fever/WHO_TRS_872_A2.pdf

WHO: World Health Organization [online]. **The yellow fever situation in Africa and South America in 2004**. Geneva, Switzerland. Weekly Epidemiological Record, 2005; 80: 29. [capturado em 16 mar. 2014]. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2005/wer8029.pdf?ua=1>

WHO: World Health Organization [online]. **Yellow Fever**. Geneva: Switzerland, 2000. [capturado 08 jul. 2013] Disponível em: http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/Yellow_fever.pdf

Wong ML, Medrano JF. **Real-time PCR for mRNA quantitation**. Biotechniques, 2005; 39: 1-11.

Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. **Statistical analysis of real-time PCR data**. Bioinformatics, 2006; 7:85.