

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



Oscar de Souza Monteiro

**Validação de Método de Ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a
Detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* Contaminantes em Cultivos Celulares**

Dissertação de Mestrado

Duque de Caxias
2022

Oscar de Souza Monteiro

Validação de Método de Ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a Detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* Contaminantes em Cultivos Celulares

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa interinstitucional de Pós-graduação em Biomedicina Translacional, BIOTRANS, da Universidade UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: DSc. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira

Coorientadora: DSc. Áurea Valadares Folgueras Flatschart

Duque de Caxias

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

M775v

Monteiro, Oscar de Souza.

Validação de método de ensaio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* contaminantes em cultivos celulares / Oscar de Souza Monteiro. – Duque de Caxias, RJ: UNIGRANRIO, 2022.
70 f.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional). - UNIGRANRIO. Escola de Ciências da Saúde. Rio de Janeiro, 2022.

Orientador: Leonardo da Cunha Boldrini Pereira.

Coorientadora: Áurea Valadares Folgueras Flatschart.

1. Micoplasmas. 2. PCR. 3. Ensaio de detecção. 4. Validação. 5. ddPCR. I. Pereira, Leonardo da Cunha Boldrini. II. Flatschart, Áurea Valadares Folgueras. III. Título. IV. Unigranrio.

CDD – 575.1

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

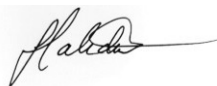
Às 13 horas, do dia 06 de dezembro de 2022, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Dissertação de versando sobre o projeto intitulado “Validação de Método de Ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a Detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma* Contaminantes em Cultivos Celulares”, de autoria de Oscar de Souza Monteiro, aluno do Mestrado Acadêmico, sob orientação dos Professores Leonardo da Cunha Boldrini Pereira e Aurea Valadares Folgueras Flatschart. A sessão foi aberta pelo Prof. Pedro Hernan Cabello, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Roberto Becht Flatschart e Prof. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso. Em seguida, passou à palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, o candidato foi arguido pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **SATISFATÓRIAS**.

O presidente declarou o mestrando Oscar de Souza Monteiro **APROVADO**, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

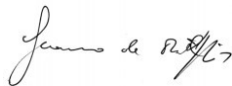
Duque de Caxias, 06 de dezembro de 2022.



Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO
Presidente da Banca



Prof. Dr. Roberto Becht Flatschart
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO



Prof. Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral do Programa de
Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do PPG em Biomedicina
Translacional - BIOTRANS
UNIVERSIDADE
UNIGRANRIO

(i) Aprovado com Ressalvas e Modificações

Comentários:

Aprovado sem restrições!

Presidente:



Dedico este projeto à minha família, que esteve sempre presente direta ou indiretamente em todos os momentos da minha formação.

Dedico de forma especial aos meus pais Roberta e Alexandre, meus avós Oscar, Sônia e Maria, que lutaram batalhas incessáveis dia após dia, para que eu tivesse esta oportunidade. Serei eternamente grato por me ensinarem o valor da vida que, por mais árdua que possa ser, basta vivermos fazendo o bem para que os nossos caminhos e horizontes se alonguem ao infinito.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo às instituições: PRONAMETRO/INMETRO e CAPES que me permitiram, através de auxílio financeiro, completar essa jornada repleta de desafios que foi o mestrado.

Aos meus orientadores,

DSc. Áurea Valadares Folgueras Flatschart, que me abriu as portas do mundo da pesquisa científica, me acompanha desde a graduação, com a iniciação científica. Eu não sei onde estaria e nem o que estaria fazendo, se não fosse por esta oportunidade. Agradecer também as reuniões, que foram de extrema importância na organização dos objetivos propostos pelo projeto, aos momentos que refizemos conta por conta dos planejamentos dos experimentos. Muito obrigado!

DSc. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira, que me acolheu no LABIO e me aceitou como seu orientado no PPGBIOTRANS, por sempre acompanhar o projeto de perto e me auxiliar em todas as questões acadêmicas.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa,

ao José Lafaiete, que ao concluir a sua dissertação de mestrado, abriu a possibilidade para o nascimento deste projeto de pesquisa. Por ser sempre muito solícito, estar sempre ao meu lado na bancada, auxiliando, conferindo contas. Este projeto não seria o mesmo sem você!

A Mayane Ribeiro por dividir toda a sua experiência em laboratório comigo, sem perder a paciência (e alguns reagentes também).

A Giulia Gall e Lorena Henrique, que sempre me motivaram, me fizeram rir bastante. Esses momentos de descontração foram fundamentais para que o meu dia se tornasse, de certa forma, mais leve.

Aos meus amigos,

por estarem sempre presentes, desde a celebração de um experimento bem sucedido, até as reclamações sobre os erros cometidos.

“Não é a mais forte das espécies que sobrevive, tampouco a mais inteligente. É aquela que se adapta melhor à mudança.”

- Charles Darwin

RESUMO

Contaminações por micoplasmas são problemas relevantes em cultivos celulares, pois podem promover alterações citopáticas *in vitro*, originando resultados irreproduzíveis e errôneos que contribuem para o aumento das despesas laboratoriais. Diversas técnicas têm sido utilizadas para detectar micoplasmas, contudo, muitas delas são demoradas, pouco sensíveis, difíceis de interpretar ou não permitem a detecção das principais espécies destes contaminantes. Em virtude disso, o propósito da dissertação é validar um método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção de *Mycoplasma* e *Acholeplasma*, desenvolvido no INMETRO, em projeto de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (2018). A validação é de extrema importância para assegurar que a nova metodologia estabelecida está apta ao seu objetivo proposto. Para tal fim, foram utilizados como matrizes e padrões, respectivamente: (i) amostras de culturas celulares previamente testadas por método bioquímico para confirmação de que estavam livres de contaminação, (ii) DNA de bactérias filogeneticamente relacionadas aos microrganismos de interesse e (iii) DNA de *Mycoplasma orale*, *M. arginini* e *Acholeplasma laidlawii*. Os dois últimos itens foram gentilmente cedidos pelo INCQS-Fiocruz ou pela UFF, sendo *Mycoplasma* e *Acholeplasma* sequenciados e quantificados por PCR digital (ddPCR). Os experimentos foram realizados em consonância com a ISO 17.025, seguindo as orientações do DOQ-CGCRE-008, que demanda testes de seletividade e definição do limite de detecção para métodos qualitativos. Durante os ensaios de seletividade notamos a amplificação específica das bandas de 70pb e 148pb apenas nos microrganismos de interesse. Além disto, foi possível verificar que, quando presentes, as matrizes celulares utilizadas interferiram positivamente na intensidade das bandas específicas de *Mycoplasma* e *Acholeplasma*. Nos ensaios de determinação do Limite de Detecção do método, identificamos que a PCR em validação pôde detectar pelo menos 5 cópias de DNA de *A. laidlawii* em 20 μ L de reação e 100 cópias de DNA de *M. orale* em 20 μ L de reação.

Palavras-chave: Micoplasmas, PCR, Ensaio de Detecção, Validação, ddPCR.

ABSTRACT

Mycoplasma contamination is a relevant problem in cell cultures as it can promote cytopathic changes in vitro, leading to non-reproducible and erroneous results that contribute to increased laboratory costs. Several techniques have been used to detect mycoplasma, but many of them are time-consuming, not very sensitive, difficult to interpret, or do not allow detection of the main species of these contaminants. The aim of the dissertation is the validation of a polymerase chain reaction (PCR) method developed at INMETRO for the detection of Mycoplasma and Acholeplasma in a master's project of the Graduate Program in Biotechnology (2018). Validation is extremely important to ensure that the newly established methodology is suitable for the proposed goal. For this purpose, the following were used as matrices or standards: (i) cell culture samples previously tested by biochemical methods to confirm that they were free from contamination, (ii) DNA from bacteria phylogenetically related to the microorganisms of interest, and (iii) DNA from *Mycoplasma orale*, *M. arginini* and *Acholeplasma laidlawii*. The last two items were kindly provided by INCQS-Fiocruz or UFF, and *Mycoplasma* and *Acholeplasma* were sequenced and quantified by digital PCR (ddPCR). The experiments were performed according to ISO 17025 following the guidelines of DOQ-CGCRE-008, which require selectivity testing and the definition of the limit of detection for qualitative methods. During the selectivity assays we noted the specific amplification of the 70bp and 148bp bands only in the microorganisms of interest. Furthermore, it could be demonstrated that the cell matrices used, if present, interfered positively with the intensity of the specific bands of *Mycoplasma* and *Acholeplasma*. In the tests to determine the limit of detection of the method, we found that the PCR in the validation, was able to detect at least 5 copies of *A. laidlawii* DNA in 20 μ l reaction and 100 copies of *M. orale* DNA in 20 μ l reaction.

Keywords: Mycoplasmas, PCR, Detection Assay, Validation, ddPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Frequência de Detecção de <i>Mycoplasma</i> spp. em Cultivos Celulares . . .	20
Figura 2 – Fotografias de Diferentes Mollicutes Incorporados na CBRVS Cultivados em Meio Frey Modificado Sólido com Aumento de 100X	29
Figura 3 – Espectrofotômetro	35
Figura 4 – Equipamentos que fazem parte do Sistema QX-200 de ddPCR	37
Figura 5 – Bio-Rad GelDoc	38
Figura 6 – Fotografias das colônias de micoplasmas obtidas em meio sólido através do plaqueamento de diferentes diluições (10^1 , 10^3 e 10^5) da cultura em caldo de <i>Acholeplasma laidlawii</i>	39
Figura 7 – Fotografias das colônias de micoplasmas obtidas em meio sólido através do plaqueamento de diferentes diluições (10^1 , 10^3 e 10^5) da cultura em caldo de <i>Mycoplasma arginini</i>	39
Figura 8 – Fotografias das colônias de micoplasmas obtidas em meio sólido através do plaqueamento de diferentes diluições (10^1 , 10^3 e 10^5) da cultura em caldo de <i>Mycoplasma orale</i>	40
Figura 9 – Verificação de Ausência de Mycoplasmas nas Matrizes por PCR utilizando o par de iniciadores Myc_spp_deg (F e R) (RAMOS JUNIOR, 2018) . . .	42
Figura 10 – Cladograma da Análise Filogenética das amostras SALA (Sequência de <i>A. laidlawii</i>), SORA (Sequência de <i>M. orale</i>) e SARG (Sequência de <i>M. arginini</i>).	47
Figura 11 – Primeira Quantificação dos padrões de DNA das diferentes espécies de micoplasmas por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/uL de reação das diluições 1/10 dos diferentes dos padrões: <i>M. orale</i> , <i>M. arginini</i> e <i>A. Laidlawii</i> . Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR	48
Figura 12 – Cálculo das novas diluições dos padrões de DNA das diferentes espécies de micoplasmas para Quantificação absoluta por ddPCR. De cada, foram preparadas soluções com concentração 6.666 cópias/ μ L (conforme dados de espectrofotometria), aplicando-se por reação 3 μ L de amostra. Desta forma, espera-se que cada diluição apresente 20.000 cópias nos 20 μ L de reação de ddPCR.	50

Figura 13 – Segunda Quantificação dos padrões de DNA das diferentes espécies de micoplasmas por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/uL de reação das diluições dos diferentes dos padrões: <i>M. orale</i> , <i>M. arginini</i> e <i>A. laidlawii</i> . Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR.	51
Figura 14 – Quantificação de diluições do padrão de DNA de <i>Mycoplasma orale</i> por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/uL de reação das diluições do padrão em caracterização. Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR.	53
Figura 15 – Quantificação de diluições do padrão de DNA de <i>Acholeplasma laidlawii</i> por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/uL de reação das diluições do padrão em caracterização. Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR.	55
Figura 16 – Quantificação de diluição do padrão de DNA de <i>Mycoplasma orale</i> por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/uL de reação da diluição do padrão em caracterização. Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR.	57
Figura 17 – Produtos da PCR desenvolvida com iniciadores Myc_spp_deg e A.laid3 (Multiplex) de <i>M. orale</i> , <i>M. arginini</i> e <i>A. laidlawii</i> com diferentes matrizes, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%	58
Figura 18 – Produtos da PCR desenvolvida com iniciadores A.laid3 F e R (Singleplex) de <i>A. laidlawii</i> com diferentes matrizes, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%	59
Figura 19 – Seletividade da PCR com <i>A. laidlawii</i> e Bactérias Filogeneticamente Próximas	59
Figura 20 – Exemplo de Gráfico Gerado pelo ImageJ	60
Figura 21 – Densitometria Óptica da Seletividade com <i>A. laidlawii</i>	61
Figura 22 – Limite de Detecção Preliminar da PCR desenvolvida com iniciadores A.laid3 F e R (Singleplex) de <i>A. laidlawii</i> com matriz MCF-7, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%	62
Figura 23 – Limite de Detecção Preliminar da PCR desenvolvida com iniciadores Myc_spp_deg F e R (Singleplex) de <i>M. orale</i> , visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%	62

Figura 24 – Limite de Detecção Definitivo da PCR desenvolvida com iniciadores A.laid3 F e R (Singleplex) de <i>A. laidlawii</i> com matriz MCF-7, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%	63
Figura 25 – Limite de Detecção Definitivo da PCR desenvolvida com iniciadores Myc_spp_deg F e R (Singleplex) de <i>M. orale</i> , visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Métodos para Detecção de Micoplasmas: Sensibilidade; Vantagens e Desvantagens	22
Quadro 2 – Condições de Ciclagem para a PCR Multiplex e Singleplex	33
Quadro 3 – Estimativa de Concentração do gDNA de cada uma das espécies de micoplasmas extraídos	40

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Apresentação do número de eventos positivos, negativos e totais em cada amostra da Primeira Quantificação dos Padrões de DNA. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR 49
- Gráfico 2 – Apresentação do número de eventos positivos, negativos e totais em cada amostra da Segunda Quantificação dos Padrões de DNA. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR 52
- Gráfico 3 – Apresentação do número de eventos positivos, negativos e totais em cada amostra da Quantificação dos Padrões de DNA de *Mycoplasma orale*. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR 54
- Gráfico 4 – Apresentação do número de eventos positivos, negativos e totais em cada amostra da Quantificação dos Padrões de DNA de *Acholeplasma laidlawii*. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – MasterMix para Reação de PCR em Multiplex com iniciadores Myc_spp e A.laid3	33
Tabela 2 – Verificação de Ausência de Mycoplasmas nas culturas de células a serem utilizadas como Matrizes, utilizando ensaio bioquímico por bioluminescência <i>MycoAlertTM PLUS Mycoplasma Detection kit</i> , Lonza	41
Tabela 3 – Resultados dos Sequenciamentos de DNA dos Microrganismos de Referência oriundos da UFF	43
Tabela 4 – Detalhes sobre as buscas por sequências similares realizadas com o programa BLAST no Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov.br) para a confirmação de identidade dos Microrganismos de Referência Cedidos pela UFF	44
Tabela 5 – Resultados dos Sequenciamentos de DNA dos Microrganismos de Referência oriundos do INCQS.	45
Tabela 6 – Detalhes sobre as buscas por sequências similares realizadas com o programa EzBioCloud (http://www.ezbiocloud.net/) para a confirmação de identidade dos Microrganismos de Referência Cedidos pelo INCQS-Fiocruz. Amostras: SALA (Sequencia de <i>A. laidlawii</i>) , SORA (Sequencia de <i>M. orale</i>) e SARG (Sequencia de <i>M. arginini</i>)	46
Tabela 7 – Resultados da quantificação absoluta por ddPCR dos padrões de DNA de diferentes espécies de micoplasmas	52
Tabela 8 – Resultados da quantificação absoluta por ddPCR dos padrões de DNA de <i>Mycoplasma orale</i> com valores de correção e porcentagem de gotículas positivas. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR	56
Tabela 9 – Cálculo das novas diluições do padrão quantificado por ddPCR de DNA de <i>Mycoplasma orale</i> para curva de diluição seriada a ser utilizada para Limite de detecção preliminar e Limite de detecção definitivo	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CBRVS	Coleção de Bactérias de Referência em Vigilância Sanitária
CP/RCT	Cópias de DNA por Reação
CP/UL	Cópias de DNA por Microlitro
DIMAV	Diretoria de Metrologia Aplicadas às Ciências da Vida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization
LABIO	Laboratório de Bioengenharia Tecidual
LOD	Limite de Detecção
MCP-1	Proteína Químioatraente de Monócitos -1
MTT	Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
UFF	Universidade Federal Fluminense

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Classe Mollicutes:	20
1.2	Métodos de Detecção para Micoplasmas:	21
1.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Micoplasmas:	23
1.4	Validação de Métodos Analíticos:	23
1.5	PCR Digital (ddPCR):	24
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral:	26
3.2	Objetivos Específicos:	26
4	METODOLOGIA	27
4.1	Materiais e Métodos	27
4.1.1	Microrganismos de referência e culturas celulares:	27
4.1.2	Extração do DNA genômico e desenvolvimento de padrões e controles:	27
4.1.3	Sequenciamento e Análise Filogenética dos Microrganismos de Referência:	30
4.1.3.1	PCR com Oligonucleotídeos Universais:	30
4.1.3.2	Sequenciamento dos Amplicons:	31
4.1.3.3	Análise Filogenética:	31
4.1.4	Ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Validação:	32
4.1.4.1	Seletividade:	34
4.1.4.2	Limite de Detecção (LD):	34
4.2	Instrumentos de Medição:	35
4.2.1	Espectrofotômetro	35
4.2.2	ddPCR – <i>Droplet Digital PCR System</i> (Sistema de PCR Digital em Gotículas)	35
4.2.2.1	<i>Automated Droplet Generator</i> - AutoDG (Gerador Automatizado de Gotículas)	35
4.2.2.2	<i>PX1 PCR Plate Sealer</i> (Seladora de Placas)	36
4.2.2.3	Termociclador	36
4.2.2.4	QX200 Droplet Reader (Leitor de Gotículas)	36
4.2.3	Molecular Imager® Gel Doc TM XR System (Bio-Rad)	37
5	RESULTADOS	39
5.1	Microrganismos de Referência:	39
5.2	Culturas Celulares:	41
5.3	Confirmação de Identidade dos Microrganismos de Referência:	42

5.4	Extração do DNA Genômico e Desenvolvimento de Padrões e	
	Controles:	47
5.5	Ensaio de validação da PCR:	58
5.5.1	Seletividade:	58
5.5.2	Densitometria Óptica:	60
5.5.3	Limite de Detecção (LOD):	61
5.5.3.1	Limite de detecção preliminar:	61
5.5.3.2	Limite de detecção definitivo:	62
6	DISCUSSÃO:	64
	REFERÊNCIAS	66

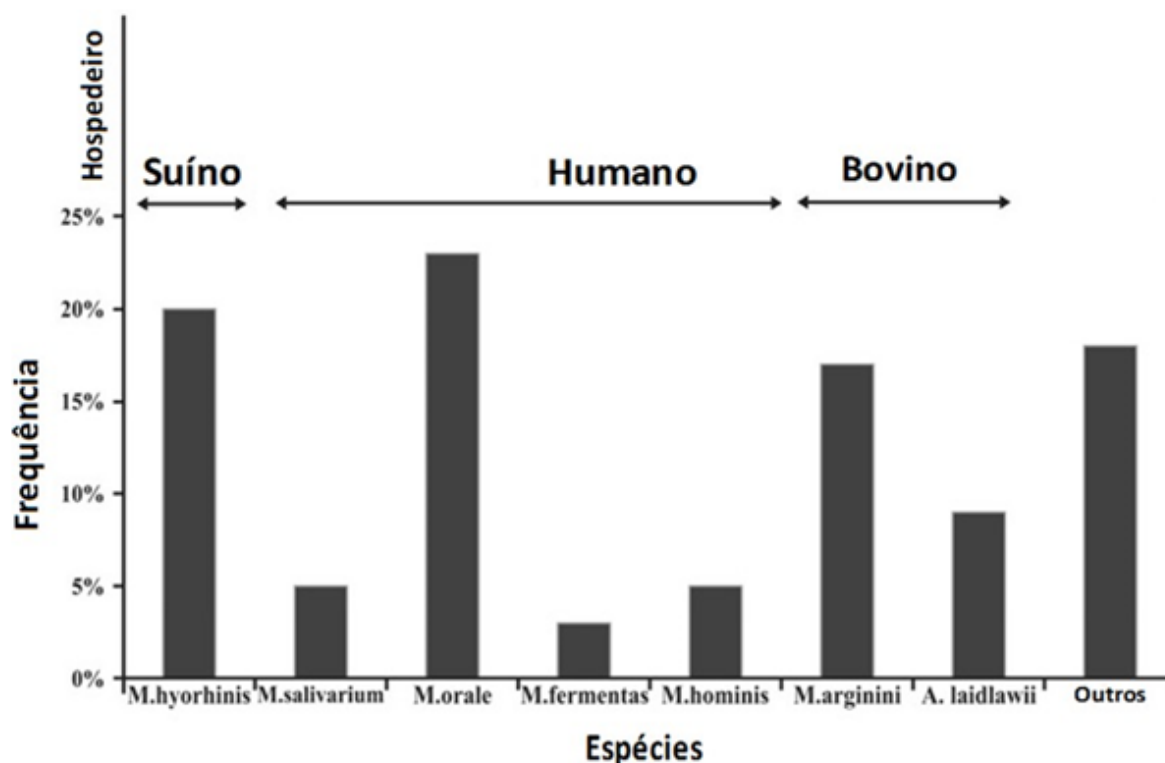
1 INTRODUÇÃO

Conhecida historicamente como cultura de tecidos, a cultura de células foi desenvolvida com o intuito de estudar a biologia das células de tecidos animais. Atualmente a técnica consiste em um conjunto de métodos desenvolvidos para isolar, manter e proliferar células, viabilizando o seu estudo em condições controladas e livres de interferências sistêmicas dos organismos que lhes deram origem (FRESHNEY, 2015) .

A contaminação dessas culturas celulares é um problema antigo, cujos primeiros relatos remontam à década de 50 (ROBINSON, 1956). O problema é muitas vezes negligenciado, por isso, pode ser apontado como um dos diversos componentes responsáveis pelo que se conhece hoje como a “crise de irreprodutibilidade” (BAKER, 2016) . A reprodutibilidade em estudos pré-clínicos, que abrange a negligência no cultivo de células, custa 28 bilhões de dólares anuais apenas nos Estados Unidos (FREEDMAN, 2015).

As contaminações celulares podem ser devidas a agentes biológicos ou químicos. Os contaminantes biológicos mais encontrados em células são micoplasmas, vírus, bactérias e leveduras. A presença das leveduras ou bactérias em cultivos celulares, na maior parte das ocorrências, é facilmente detectada macro e microscopicamente. Contudo, contaminações provenientes de agentes como micoplasma e vírus podem passar despercebidas (VOLOKHOV, 2011). Existem diferentes fontes de contaminação por micoplasmas em cultivos celulares, definindo-se normalmente como as principais, as associadas aos humanos, bovinos e suínos (Figura 1).

Os operadores nos laboratórios são as principais fontes de *M. orale*, *M. fermentans* e *M. hominis*. Estas espécies de micoplasmas equivalem a mais da metade de todas as contaminações por micoplasma em cultura de células e, fisiologicamente, são encontradas no trato orofaríngeo humano. *M. arginini* e *A. laidlawii* são outros dois contaminantes comuns em culturas de células e são oriundos do soro fetal bovino (SFB). Já as soluções de tripsina constituem a maior fonte de *M. hyorhinis* (SHMUEL, 1998).

Figura 1 – Frequência de Detecção de *Mycoplasma* spp. em Cultivos Celulares

Fonte: Adaptado de Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012).

1.1 Classe Mollicutes:

Conhecidos comumente como Micoplasmas, as bactérias da classe Mollicutes, no filo dos procariotos, incluem as mais simples e menores formas de vida com capacidade de autorreplicação (NIKFARJAM; FARZANEH, 2012). São bactérias que apresentam elevada proporção de guanina e citosina em seu genoma e, por isso, estima-se que sejam evolutivamente provenientes de bactérias gram-positivas (CITTI; BLANCHARD, 2013). A maioria dos micoplasmas são parasitas que exibem rigorosas especificidades a hospedeiros e tecidos. A dependência desses micoplasmas em relação às células eucarióticas dá-se por possuírem um dos menores genomas procarióticos (aproximadamente 0,6Mb), carecendo de alguns genes para a síntese de mensageiros de macromoléculas primordiais. (OLARERIN-GEORGE; HOGENESCH, 2015)

Uma característica comum a todos os membros deste grupo é a ausência de parede celular, o que lhes confere pleomorfismo, que pode ocorrer por dois mecanismos distintos: resposta ao ambiente ou mudanças aleatórias da expressão gênica, que suscita a sua fusão com a membrana das células hospedeiras e permite o compartilhamento dos seus componentes citoplasmáticos e de membrana, assim como o uso dos metabólitos celulares necessários para a sua proliferação (TANG, 2000). Ainda com relação a essa característica, podemos apontar como peculiaridades: a resistência dos micoplasmas a alguns antibióticos

como a Penicilina (cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese da parede celular) e sua capacidade de atravessar os filtros normalmente utilizados nos processos de esterilização de meios de cultura (filtros de 0,2 μ m) (JEAN, 2017). Vale mencionar que existem antibióticos eficazes contra micoplasmas, no entanto, seu uso contínuo pode promover citotoxicidade, sendo estes tratamentos apenas aconselhados quando as células são valiosas e impossíveis de serem substituídas (NIKFARJAM; FARZANEH, 2012)

As contaminações por micoplasmas podem acarretar alterações nas culturas celulares como, por exemplo: alterações no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) com efeito direto no suprimento de energia; em cromossomos e no metabolismo de aminoácidos e ácidos nucleicos, em especial, metabolismo da arginina, purinas e biossíntese de aminoácidos, semelhantes às mudanças que ocorrem por decorrências nutricionais, com redução da taxa de crescimento (YU, 2016). Da mesma forma, podem induzir a secreção das citocinas pró-inflamatórias, tal como: fatores de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 e IL-6, quimiocinas, como IL-8, proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), proteína inflamatória de macrófagos 1 (MIP- 1 α), fatores estimulantes de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSFs), bem como prostaglandinas e óxido nítrico (ROTTEM, 2003). É importante salientar que a gravidade do efeito citopático varia conforme a espécie de micoplasma, o tipo de célula alvo, a intensidade de infestação e o tempo de contato com a cultura celular (NETTO, 2014). Pelo exposto, a contaminação das células em cultura por micoplasmas podem colocar em dúvida os resultados de ensaios *in vitro* como, por exemplo, as avaliações de citotoxicidade por viabilidade celular, utilizando MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol- 2yl)-2,5-difenil tetrazolio] e Vermelho Neutro, importantes em ensaios normatizados para avaliar a segurança de fármacos, biomateriais e cosméticos. Assim, podem provocar atrasos e perda financeira com descarte de produtos contaminados, requerendo esforços para sua detecção e eliminação, apontando a importância do controle da presença destes microrganismos nas indústrias biotecnológicas (NETTO, 2014; OLIVEIRA, 2013).

1.2 Métodos de Detecção para Micoplasmas:

Diversas técnicas têm sido utilizadas para detectar micoplasmas, como o Isolamento em Meio de Cultura, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Técnicas de Coloração Fluorescente do DNA, Microscopia Fluorescente e Ensaios de Detecção de Níveis de Anticorpos referentes a agentes específicos (YOUNG, 2010; ZHI, 2010), conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Métodos para Detecção de Micoplasmas: Sensibilidade; Vantagens e Desvantagens

Método	Sensibilidade	Vantagens	Desvantagens
Coloração direta de DNA	Baixa	Rápido, barato	Difícil interpretação
Coloração indireta de DNA com indicador celular	Alta	Fácil de interpretar devido a amplificação da contaminação	Demorada
Agar e Caldo nutriente	Alta	Sensível	Lenta e talvez necessite interpretação qualificada
PCR	Alta	Rápido	Requer otimização
Nested PCR	Alta	Rápido	Mais sensível que PCR, porém possui taxa elevada de falsos positivos
ELISA	Moderada	Rápido	Espécies limitadas para detecção
Autorradiografia	Moderada	Rápido	Difícil interpretação se contaminação estiver em baixa intensidade
Imunocoloração	Moderada	Rápido	Difícil interpretação se contaminação estiver em baixa intensidade

Fonte: Adaptado de (YOUNG, 2010)

Os ensaios mencionados no Quadro 1 são qualitativos, muito utilizados na prática laboratorial para a determinação da presença ou ausência de um determinado analito na amostra. Neste caso, estes ensaios apresentam como resultado a “presença” ou “ausência” dos micoplasmas contaminantes nas culturas celulares. Este tipo de resultado é suficiente para o diagnóstico em questão, não sendo necessário utilizar, para este fim, métodos quantitativos que determinariam a quantidade de micoplasmas contaminantes nas amostras. Geralmente os insumos e equipamentos para a realização de ensaios quantitativos são mais caros e requerem mais tempo de execução, dessa forma, surge a necessidade de se obter alguma confirmação prévia, com um sistema de triagem (TRULLOLS, 2004).

Muitos dos métodos citados são reconhecidos pela comunidade científica, contudo, podem ser demorados, pouco sensíveis, difíceis de interpretar ou não permitir a detecção das principais espécies de *Mycoplasma*. De modo a solucionar estas limitações, instituições normalizadoras e regulamentadoras, como o FDA (Food and Drug Administration) e a Farmacopeia Europeia, têm aceitado o método de PCR como um método alternativo às

técnicas padrão ouro de detecção (DREXLER; UPHOFF, 2002).

1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Micoplasmas:

Os métodos de detecção ideais devem ser sensíveis e específicos, mas também simples, rápidos, eficientes e econômicos (HOORFAR, 2004). O método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método molecular que permite a detecção de forma rápida e sensível de segmentos específicos de DNA. Por sua ampla disponibilidade no mercado, um dos kits comerciais de PCR mais utilizado por laboratórios de cultura de células em todo o mundo é o *Look@Out* (Sigma-Aldrich). Apesar da comodidade de uso desse teste pré-validado, temos como inconveniente seu alto custo, que inviabiliza muitas vezes a realização desses testes no controle de qualidade das culturas celulares com a periodicidade em que deveriam ocorrer. Em nosso laboratório, esses testes devem ser feitos nos estoques celulares sempre que um novo lote do *masterbank* é produzido e estocado, nos novos meios de cultura e soluções produzidas, nas culturas celulares antes e após cada ensaio ou experimento e em qualquer caso de suspeita de contaminação. Com uma alta demanda de ensaios, temos usado preferencialmente um método bioquímico na rotina diária. Entretanto, conforme as diretrizes da (OECD, 2018), gostaríamos de poder realizar também em nossa rotina de controle de qualidade a PCR como um segundo método independente para confirmação dos resultados. Entretanto, isto torna-se inviável pelo alto custo dos produtos comerciais disponíveis. Assim, buscando uma melhor relação custo e benefício, neste trabalho propomos realizar a Validação de um ensaio de PCR previamente desenvolvido no INMETRO para a detecção de micoplasmas em culturas celulares e seus insumos (RAMOS JUNIOR, 2018).

1.4 Validação de Métodos Analíticos:

A validação de qualquer método analítico (quantitativo ou qualitativo) deve ser realizada antecipadamente a sua aplicação na rotina laboratorial de ensaios, para que suas características de desempenho sejam definidas e devidamente avaliadas. Documentos normativos como a ISO/IEC17025 (2017) e o DOQ-CGCRE-008 (2020) REV.09 reforçam que:

“Os laboratórios disponham de meios, critérios e objetivos para comprovar, por meio da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida”.

O método é considerado validado quando o mesmo é avaliado segundo uma série de parâmetros estabelecidos e equipamentos suficientemente confiáveis para que as decisões relacionadas possam ser tomadas com confiança. Neste trabalho, foram utilizados como referência padrões de DNA de micoplasmas de diferentes espécies quantificados por PCR digital, o método de referência para a quantificação absoluta de ácidos nucleicos

considerado pelo JCTLM (*Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine*), <https://www.jctlmdb.org/>.

1.5 PCR Digital (ddPCR):

A PCR digital foi criada para superar as limitações da PCR convencional em relação à detecção quantitativa precisa de alvos moleculares. A ddPCR traz vantagens como: Aprimoramento da precisão; Menos interferência de inibidores de PCR e dispensa a criação de uma curva de calibração para estabelecer a concentração de cópias do alvo (DEPREZ, 2016), além de que, devido ao seu princípio de medição, a ddPCR é sugerida como um método primário para certificar materiais de referência (DALMIRA, 2016), já que os valores obtidos por ddPCR para a concentração de cópias de DNA podem ser rastreáveis metrologicamente para o Sistema Internacional de Unidades (SI) (DUEWER, 2018).

Os princípios da PCR digital são baseados na divisão da amostra em centenas ou milhares de compartimentos independentes, esses compartimentos são geralmente criados por meio de microfluídica ou gel emulsivo. A amplificação ocorre de forma individual em cada compartimento, permitindo que o número de cópias geradas seja diretamente proporcional ao número de moléculas de DNA presentes no início da reação. A detecção e quantificação dos produtos de amplificação é feita por meio da adição de um componente fluorescente, e com base na amplitude de fluorescência, um limite simples atribui cada gota como positiva ou negativa (HINDSON, 2011).

A padronização do volume da gota é de suma importância na utilização desta técnica, pois um volume incorreto levará a uma subestimação ou superestimação do número de cópias, podendo ter efeitos nas decisões finais do ensaio (KOŠIR, 2017).

Com o volume da gota conhecido, a parcela de gotículas positivas é então usada para estimar a concentração absoluta da sequência alvo. Como os fragmentos de DNA na reação são distribuídos randomicamente pelas partições de gotas, uma correção com o cálculo estatístico de Poisson possibilita atribuir as possibilidades das gotas terem nenhuma, ou uma, ou até várias cópias. Logo, modelos estatísticos são aplicados para calcular os limites de confiança das estimativas de concentração e suas razões. Para 20.000 gotas, a faixa dinâmica para quantificação absoluta vai de uma única cópia até aproximadamente 100.000 cópias. (HINDSON, 2011)

2 JUSTIFICATIVA

Em consequência ao alto custo dos kits comerciais para detecção de micoplasmas contaminantes em culturas celulares e à falta de conhecimento acerca dos componentes e funcionamento desses *kits* que são, na realidade, uma “caixa preta” sobre a qual não temos informação, escolhemos validar internamente um ensaio de PCR para este fim.

A disponibilização deste ensaio validado é considerada prioridade nas ações do LABIO, o que resultou no desenvolvimento de uma PCR *in house* com a dissertação de RAMOS-JUNIOR (2018) pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do INMETRO e seu cadastro no Banco tecnológico do INMETRO. Neste ensaio, os reagentes necessários apresentaram custo por reação 39 vezes menor que o *Look®Out Mycoplasma Detection Kit* (Sigma-Aldrich). Em seguida, para que este ensaio possa ser utilizado na rotina do laboratório ou em uma possível transferência de tecnologia ou patente, deve ser validado conforme a ISO 17025 e o DOQ-CGCRE-008, sendo esta a ação proposta nesta dissertação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Realizar a validação do método de ensaio de PCR para detecção de micoplasmas desenvolvida por Ramos-Junior (2018) seguindo os parâmetros para validação de métodos qualitativos do DOQ-CGCRE-008.

3.2 Objetivos Específicos:

- Estudo do DOQ-CGCRE-008 de validação de métodos conforme a ISO 17.025 e planejamento dos experimentos de validação do ensaio;
- Realizar os experimentos de seletividade para validação da PCR com os iniciadores Myc_spp_deg e A.laid3;
- Realizar os experimentos para identificar o limite de detecção da PCR com os iniciadores Myc_spp_deg e A.laid3;
- Elaborar o relatório de validação.

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Microrganismos de referência e culturas celulares:

Em diferentes épocas, culturas de diferentes espécies da classe Mollicutes ou seu DNA foram cedidos pelo Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública (UFF) e pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS, INCQS, Fiocruz), para o desenvolvimento de padrões de DNA genômico (gDNA) utilizados nos testes de Seletividade e na definição do Limite de Detecção da PCR em validação. As espécies de micoplasmas utilizadas nestes trabalho foram: *Mycoplasma orale* (ATCC 23714/CMRVS #0515668), *M. arginini* (ATCC 23839/CMRVS #0615703) e *Acholeplasma laidlawii* (ATCC 14089/CMRVS #0515670), os contaminantes disponíveis mais comumente encontrados nas culturas celulares e de seus insumos.

Os sobrenadantes de culturas de diferentes células de mamíferos (humano, cão e camundongo), livres de contaminação por micoplasmas foram empregadas como matrizes nos testes de Seletividade da PCR em validação. Este material foi previamente testado quanto à presença ou ausência de micoplasmas pelo método bioquímico MycoAlertTM PLUS *Mycoplasma Detection kit*, Lonza).

4.1.2 Extração do DNA genômico e desenvolvimento de padrões e controles:

A extração do DNA genômico de cada um dos microrganismos de referência cedidos pela UFF e dos sobrenadantes de culturas celulares descritas acima foi realizada usando o kit GenEluteTM Blood Genomic DNA (Sigma Life Science), seguindo as instruções do fabricante, porém, eluídos em apenas 50µl da solução do Kit.

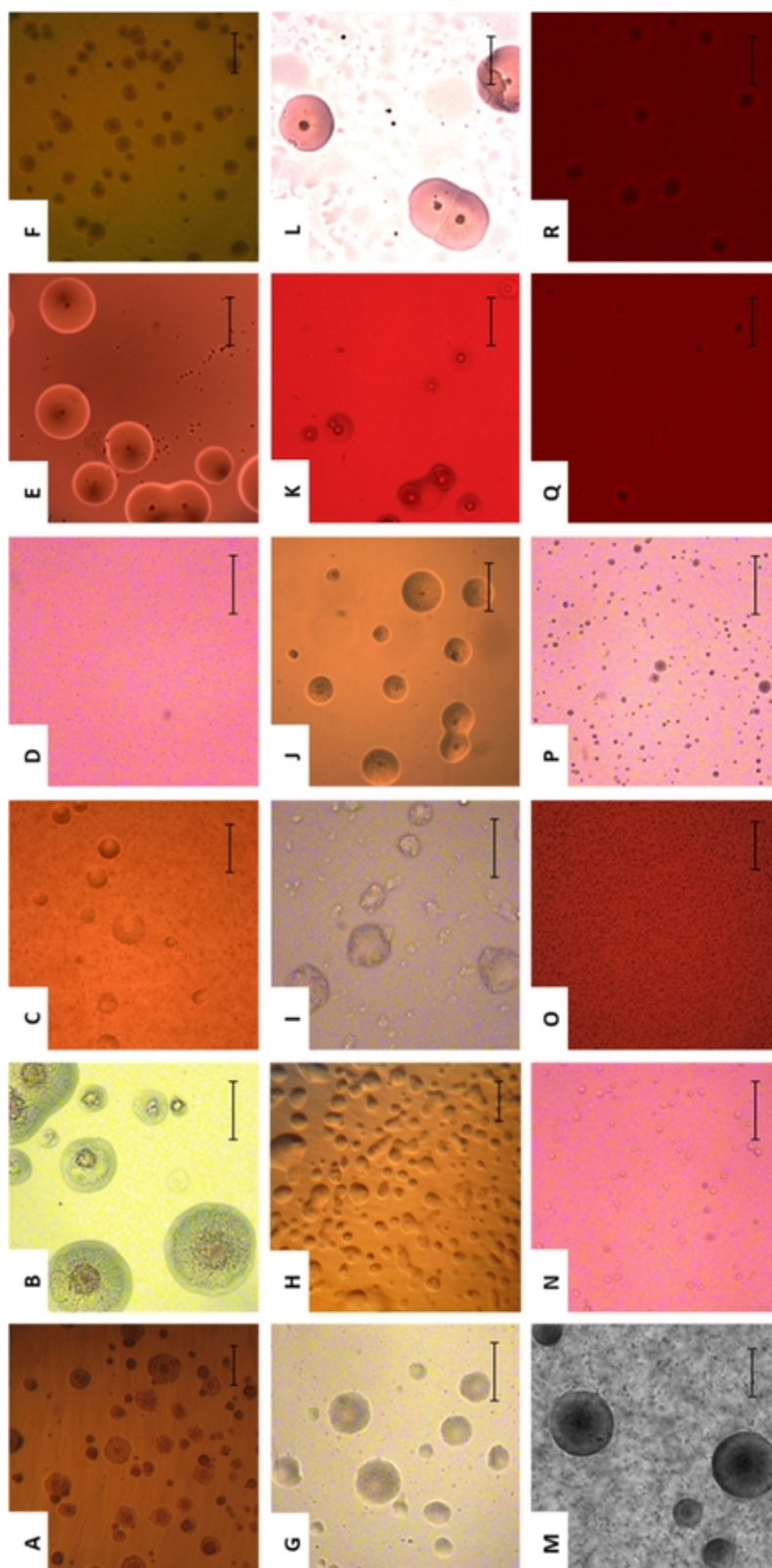
Os DNA de microrganismos de referência cedidos pelo INCQS-Fiocruz já foram disponibilizados extraídos com o protocolo recomendado para bactérias Gram negativas do kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). No ato da extração de DNA, o material a ser extraído foi inoculado seriadamente em meio de cultivo Frey modificado, que é um ajuste no meio Frey original (FREY, 1968), a eficiência do meio modificado pode ser vista na figura 2, sendo composto por 22,5 g/L base caldo para micoplasma, 12 g/L glicose, 0.025 g/L vermelho de fenol e 25% (v/v) de suplemento. O suplemento consiste de 62,5 g/L extrato de levedura, 0,625 g/L NAD, 0,625 g/L cloridrato de cisteína, 30% (v/v) de soro equino e 30% (v/v) de soro suíno. Para os meios sólidos, adicionou-se 12 g/L de agarose. Os soros foram inativados a 56 °C por 30 min, o NAD e a cisteína foram misturados e mantidos à temperatura ambiente por 15 min antes de sua adição ao suplemento; o pH final foi ajustado para 7,8. Os *Mycoplasmas* em meios de cultura líquidos e sólidos (21CAPP018) exibiram o característico crescimento. Foram utilizadas duas colunas de extração para cada lisado

celular e foram realizadas duas eluições de 75 μ L para cada coluna – perfazendo 300 μ L de cada DNA genômico, aproximadamente.

Uma avaliação preliminar dos DNA genômicos extraídos foi realizada por espectrofotometria (com o nanodrop 2000c, *Thermo Scientific*, EUA) usando a densidade óptica em 260nm para quantificação e a relação 260nm/280nm para confirmação de pureza. A quantificação absoluta do DNA de micoplasmas (em número de cópias) foi feita no sistema QX200 de *Droplet Digital PCR* (Bio-Rad, EUA) com os oligonucleotídeos projetados por Ramos-Junior (2018), com reagentes Bio-Rad® e EVAGreen®, Termociclador C1000TM Touch (Bio-Rad, EUA).

Os estoques de DNA foram mantidos em geladeira (4°C - 8°C) em microtubo selado com parafilm. Com base nos resultados de quantificação absoluta do ddPCR, foram feitas diluições seriadas para os ensaios de seletividade e Limite de Detecção.

Figura 2 – Fotografias de Diferentes Mollicutes Incorporados na CBRVS Cultivados em Meio Frey Modificado Sólido com Aumento de 100X



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

4.1.3 Sequenciamento e Análise Filogenética dos Microrganismos de Referência:

Para os microrganismos cedidos pela UFF, foram realizados os sequenciamentos no próprio laboratório (LAMAC/DIMAV/INMETRO) pelo método Sanger (SANGER; COULSON, 1975), empregando *BigDye® Terminator V3.1* e o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*, EUA). Já o sequenciamento dos microrganismos de referência cedidos pelo INCQS-Fiocruz, foram executados pela empresa ACTgene-AgregaBiotec (<https://www.agregabiotec.com/>) que, adicionalmente, incluiu como resultado a análise filogenética das sequências. A escolha na utilização de uma empresa terceirizada para o sequenciamento, deu-se pela indisponibilidade do sequenciador no LAMAC/DIMAV quando foram obtidas as amostras pelo INCQS.

4.1.3.1 PCR com Oligonucleotídeos Universais:

Os produtos das extrações dos microrganismos de referência cedidos pelo INCQS-Fiocruz foram liofilizados com SpeedVac (Eppendorf, EUA), para assegurar a sua integridade durante o transporte. Na Agrega, o material foi reidratado e submetido a PCR com iniciadores de 16S rDNA, o qual é um marcador universal para a identificação de gêneros bacterianos (WRIGHT; BAUM, 2018);(YARZA, 2014). Para a PCR foram utilizados 20ng de gDNA, Taq DNA polymerase, 10X PCR Buffer, MgCl₂, dNTPs e os seguintes oligonucleotídeos (iniciadores): 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'). O ensaio foi executado em um termociclador LGC XP Cycler (*Bioer Technology*) com uso de controles positivos e negativos para a PCR.

Os produtos das extrações dos microrganismos de referência cedidos pela UFF foram submetidos a PCR também com iniciadores universais de 16S rDNA, sendo eles: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCMTTGTAGTTT-3') (BULGARI, 2009). Para a PCR foram utilizados 3µL de gDNA, Taq DNA polymerase, 10X PCR Buffer, MgCl₂, dNTPs. O ensaio foi executado em um termociclador C1000 Touch™ (Bio-Rad, EUA).

O programa de ciclagem foi executado a 94 °C por 5 min, seguido por 37 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 10 seg e 72 °C por 1 min, com uma etapa final a 72 °C por 5 min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da presença de amplicons de tamanho esperado para o 16S rDNA (cerca de 1,5 Kb).

4.1.3.2 Sequenciamento dos Amplicons:

Tanto para as amostras **SORA** (Sequenciamento *M. orale*), **SARG** (Sequenciamento *M. arginini*) e **SALA** (Sequenciamento *A. laidlawii*), foi feito o sequenciamento por eletroforese capilar, baseado no método de Sanger, foi realizado em ambas as direções para o amplicon 16S rDNA obtido por PCR. O DNA foi purificado com o reagente ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems, EUA) e quantificado no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA).

Para a realização da PCR foram utilizados 2,5 pmol de iniciador (785F 5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3' ou 907R 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') e 0,5 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA), em um volume final de 10 µL. O ensaio foi realizado em um termociclador LGC XP Cyclor (Bioer Technology) com uma etapa de desnaturação inicial à 96 °C por 3 min, seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Após a PCR, as amostras foram purificadas por precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático armado com capilares de 50cm e polímero POP7 (AB 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, EUA).

Os dados do sequenciamento foram coletados utilizando o programa Data Collection 3 (Applied Biosystems, EUA) com os parâmetros Dye Set "Z"; Mobility File "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"; BioLIMS Project "3500_Project1"; Run Module 1 "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"; e Analysis Module 1 "BC-3500SR_Seq_FASTA.saz". Os arquivos resultantes do Data Collection foram convertidos em arquivos FASTA pelo Sequence Analysis Software v. 6 (Applied Biosystems, EUA).

4.1.3.3 Análise Filogenética:

Adicionalmente ao que foi solicitado a Agrega, foi realizada a análise filogenética das sequências obtidas para o DNA de cada espécie enviada, comparando-as às depositadas em banco de dados de 16S rDNA com qualidade controlada no EzBioCloud (YOON, 2017). Sequências de 16S rDNA do gênero de interesse e de um grupo externo foram obtidas em bancos de dados (LPSN, lpsn.dsmz.de ou BacDive, bacdiva.dsmz.de) e utilizadas para inferência filogenética por Máxima Verossimilhança. O grupo externo foi selecionado por compartilhar a mesma família do gênero analisado, de acordo com dados do Genome Taxonomy Database (GTDB, gtdb.ecogenomic.org/tree). As sequências foram alinhadas com o SINA 1.2.11 (PRUESSE, 2012) e as posições contendo gaps foram removidas. O pacote phangorn (Schliep, 2011) v. 2.6.3 do R foi utilizado para reconstruir uma árvore de neighbor joining (NJ). A função ModelTest foi utilizada para selecionar o melhor modelo

conforme o critério de informação Akaike, utilizado para construir árvores filogenéticas usando a estimativa de ML e empregando a árvore de NJ como ponto de partida. Um modelo com número de 500 *bootstraps* não paramétricos foi calculado. A árvore foi enraizada no grupo externo. Os pacotes phytools (REVELL, 2012) v.0.7-70 e ggtree (YU, 2017) v.2.4.2 do R foram usados para visualizar e editar as árvores e cladogramas.

4.1.4 Ensaios da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Validação:

Os ensaios de PCR comerciais com o objetivo de detectar micoplasmas, em sua grande maioria, utilizam oligonucleotídeos para a região conservada do gene 16S rDNA.

A PCR proposta para esta validação utiliza oligonucleotídeos (Myc_spp_deg e A.laid3) para diferentes RNA transportadores, presentes em cópia única no genoma (o que possibilita a sua quantificação absoluta por microrganismo). Definido anteriormente, as concentrações ideais dos pares F/R de Myc_spp_deg na reação foram 0,16 / 0,16 μM e dos pares de A.laid3 em 0,24-0,16 μM

Os iniciadores Myc_spp_deg F e R para *Mycoplasma*, tem como alvo: (i):tRNA-Fenil alanina, tRNA-Aspartato e regiões espaçadoras. Já os iniciadores A.laid3 F e R para *Acholeplasma*, tem como alvo: (i)-Gene para transcrição de Proteína Integral de Membrana (WP_006784049.1); (ii)-tRNA-Leucina e regiões espaçadoras; (iii)-tRNA-Glicina e tRNA-Prolina; (iv)-tRNA-Leucina, tRNA-Glutamina e regiões espaçadoras; (v)-tRNA-Glutamina e tRNA-Histidina. Com as concentrações ideais dos pares de Myc_spp_deg na reação em 0,16-0,16 μM e dos pares de A.laid3 em 0,24-0,16 μM (RAMOS JUNIOR, 2018).

Para os ensaios de PCR utilizados para a confirmação da seletividade e definição do Limite de Detecção (LD) dos pares de iniciadores Myc_spp_deg e A.laid3 foram realizados, utilizando os Termocicladores C1000 Touch™ (Bio-Rad, EUA) e Veriti™ 96-Well Fast (*Applied Biosystems*, EUA) com as condições de ciclagem ilustradas na Tabela 2. As amplificações foram realizadas utilizando a JumpStart™ Taq DNA Polymerase 2.5 unidades/ μL , 10X Buffer sem MgCl_2 e MgCl_2 25mM (Sigma-Aldrich); dNTP mix PHT (Phoneutria) 10 mM; Myc_spp_deg F e R e/ou A.laid3 F e R em ensaios singleplex ou multiplex; Adaptamos as concentrações de gDNA nas reações, por meio de diluições, para cumprir com as necessidades dos diferentes ensaios, com a flutuação do volume de amostra (gDNA), também é alterado o volume de H_2O livre de nucleases (Quadro 1). A análise do resultado foi realizada por eletroforese dos produtos amplificados em gel de agarose 3% com TAE e visualização com corante intercalante, brometo de etídio. As bandas de amplificações específicas foram avaliadas por densitometria óptica no equipamento GelDoc (Bio-Rad) com o auxílio do *software ImageJ Fiji*.

Quadro 2 – Condições de Ciclagem para a PCR Multiplex e Singleplex

Termociclagem			
Programa:	Myc_spp_deg Alaid3 PCR multi		
Tampa: 105° Vol reação: 20µL			
Temp.(°C)	Tempo	Rampa	Ciclos
95	10min	P A D R Ã O	1
95	30seg		40
62	30seg		40
72	30seg		40
72	5min		1
4	∞		1

Condições de Ciclagem para PCR convencional multiplex e singleplex usando os pares de iniciadores Myc_spp_deg e A.laid3 com os termicladores Veriti (Applied Biosystems, EUA) e C-1000 touch (Bio-Rad, EUA) / Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 1 – MasterMix para Reação de PCR em Multiplex com iniciadores Myc_spp e A.laid3

Master Mix Myc_spp_deg e A.laid3		Vol. Total + 10% erro
Reagente:	Vol. Por reação (µl)	
H ₂ O	-	-
dNTPs 10mM	0,4	0,44
Myc_spp_deg F	0,8	0,88
Myc_spp_deg R	0,8	0,88
A.laid3_F	0,8	0,88
A.laid3_R	1,2	1,32
MgCl ₂ 25mM	1,2	1,32
Taq polymerase 2.5units/µL	0,4	0,44
Taq Buffer 10x	2	2,2
Amostra (DNA)	-	-
Total:	20	22

Volume dos reagentes utilizados nos ensaios de PCR convencional multiplex e singleplex usando os pares de iniciadores Myc_spp_deg e/ou A.laid3 com os termicladores Veriti (Applied Biosystems, EUA) e C-1000 touch (Bio-Rad, EUA). Observações: (i) Quando a reação foi realizada em singleplex, apenas um dos pares de iniciadores (Myc spp deg ou A.laid3) era utilizado, substituindo-se o volume correspondente ao outro par de iniciadores por água na reação; (ii) o volume final de reação (coluna central) prevê 20uL, na coluna da direita temos o volume preparado de solução-mãe prevendo perda por erro na pipetagem ao distribuir o volume de cada reação. / Fonte: Produzido pelo autor.

4.1.4.1 Seletividade:

A seletividade é um dos principais parâmetros abordados no processo de validação, uma vez que representa a capacidade em que o método pode quantificar/detectar o analito na presença de matrizes ou de outros materiais possivelmente interferentes. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (DOQ-CGCRE-008, 2020).

Por se tratar de uma PCR para detectar micoplasmas em cultivos celulares, tentamos mimetizar ao máximo esse cenário. A análise de bactérias filogeneticamente próximas já havia sido previamente realizada (RAMOS JUNIOR, 2018). Neste trabalho, avaliamos a influência de diferentes matrizes celulares e verificamos se as mesmas podem alterar de alguma forma a detecção dos microrganismos. Chamaremos de matriz tudo que é proveniente da cultura de células, suspensão constituída por restos celulares, diferentes meios de cultura, tripsina, soro fetal bovino, dentre outras substâncias. Os sobrenadantes das seguintes linhagens celulares foram utilizados: IEC-6 (BCRJ: 0117), MCF7 (BCRJ:0162), MDCK-2 (BCRJ:0170) e NIH/3T3 (BCRJ:0191).

4.1.4.2 Limite de Detecção (LD):

De acordo com o DOQ-CGCRE-008 (2020) o limite de detecção é a menor concentração detectável do alvo, com confiança, na amostra. Para este método em questão, o PCR convencional, será utilizado o critério de Avaliação/Percepção visual da presença ou ausência de bandas e a determinação do limite de detecção pela análise de amostras com concentrações predeterminadas de analito. Para tanto, diluições seriadas dos padrões do DNA das diferentes espécies de micoplasmas, previamente quantificados por ddPCR (conforme item 4.1.2), foram avaliados por PCR convencional com os pares de iniciadores Myc spp deg e A.laid.3 como descrito em 4.1.4. Essas diluições seriadas foram planejadas para obter os seguintes valores: 10.000, 1.000, 100, 10, 5, 1 e 0,1 cópias por reação de PCR (20 μ L). Foi considerado o Limite de detecção (LD) do método a menor concentração do alvo em que foi detectada sua presença no teste das amostras das diluições do alvo, teste a que demos nome de determinação do LD preliminar. A confiança no LD foi estabelecida testando por 10 vezes o alvo do LD preliminar, esperando pelo menos 90% de confiança, a este teste chamamos de determinação do LD definitivo.

4.2 Instrumentos de Medição:

4.2.1 Espectrofotômetro

Espectrofotômetro – Modelo Nanodrop 2000c (Thermo-Scientific) (Figura 3) – Permite a quantificação de ácidos nucleicos em leituras usando comprimento de onda de 260nm. Além disso, pela relação das leituras 260nm/280nm permite avaliar a pureza da amostra de ácidos nucleicos quanto à presença de proteínas. Vale mencionar aqui que, embora a relação 260nm/280nm esperada em soluções puras de DNA seja de 1,8 aproximadamente, este critério não é determinante para a exclusão de amostras para a realização posterior do PCR convencional ou mesmo ddPCR.

Figura 3 – Espectrofotômetro



Fonte: Produzido pelo autor.

4.2.2 ddPCR – *Droplet Digital PCR System* (Sistema de PCR Digital em Gotículas)

O sistema QX-200 (Bio-Rad) de ddPCR, utilizado para a quantificação absoluta do DNA dos padrões de DNA de micoplasma, é composto por vários equipamentos apresentados na Figura 4 e descritos abaixo. Além destes, descrevemos também o Termociclador, utilizado sempre junto ao sistema.

4.2.2.1 *Automated Droplet Generator* - AutoDG (Gerador Automatizado de Gotículas)

O AutoDG, do sistema QX200, é um equipamento automatizado que particiona a reação de PCR em gotículas através de um circuito microfluídico para combinar óleo e reação aquosa para gerar cerca de 20 mil gotículas/micelas do volume necessário para a análise de ddPCR. Em cada cartucho de preparo da emulsão é possível processar até oito

reações por vez em cerca de 2 minutos. Esta etapa é crítica no processo de quantificação de DNA por ddPCR e extremamente trabalhosa. O uso do equipamento automatizado torna o processo mais rápido e gerando maior número de gotículas de forma reprodutível. Após preparadas as emulsões de cada reação, estas são transferidas para poços individuais de uma microplaca de PCR de 96 posições.

4.2.2.2 *PX1 PCR Plate Sealer* (Seladora de Placas)

Este equipamento faz a selagem da placa de PCR. Tem função de selar a placa de PCR com uma folha de alumínio, para evitar a evaporação da amostra durante a termociclagem e, depois, permitir a coleta de cada reação para leitura do resultado da amplificação.

4.2.2.3 Termociclador

A termociclagem das placas de reação de ddPCR foram feitas no equipamento C1000 Touch™ (Bio-Rad, EUA), seguindo os protocolos estabelecidos anteriormente (no item 4.1.4).

4.2.2.4 QX200 Droplet Reader (Leitor de Gotículas)

Após a amplificação do DNA alvo nas reações emulsificadas, este instrumento examina cada gotícula individualmente fazendo a contagem daquelas negativas (sem amplicons) e das positivas (com amplicons) usando um sistema de detecção de fluorescência (definido para detectar marcações com FAM e VIC, HEX ou, na ausência de sondas, a marcação de produtos amplificados por interação de EvaGreen®, que foi a estratégia utilizada neste trabalho). A enumeração das gotículas PCR-positivas e PCR-negativas permitem a quantificação absoluta de ácidos nucleicos usando o software QuantaSoft (Bio-Rad).

Figura 4 – Equipamentos que fazem parte do Sistema QX-200 de ddPCR



A) QX200 Automated Droplet Generator; B) QX200 Droplet Generator; C) QX200 Droplet Reader; D) PX1 PCR Plate Sealer | Fonte: Produzido pelo autor.

4.2.3 Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad)

O Gel Documentador – *Gel Doc* (Bio-Rad) (Figura 5) - permite visualizar, por meio de um transiluminador com luz ultravioleta, as bandas de DNA separadas no gel de agarose, previamente coradas com um corante intercalante como o brometo de etídio. O equipamento conta com câmera de zoom motorizada e o programa *Quantity one* (Bio-Rad). Opcionalmente, o ImageJ (um *software* de domínio público para processamento e análise de imagens científicas, com diversas extensões e *plugins*) foi utilizado também nas análises das fotografias geradas pelo *Gel Documentador*. Neste projeto utilizamos a função de avaliação da densidade óptica das bandas visualizadas em gel de agarose.

Figura 5 – Bio-Rad GelDoc



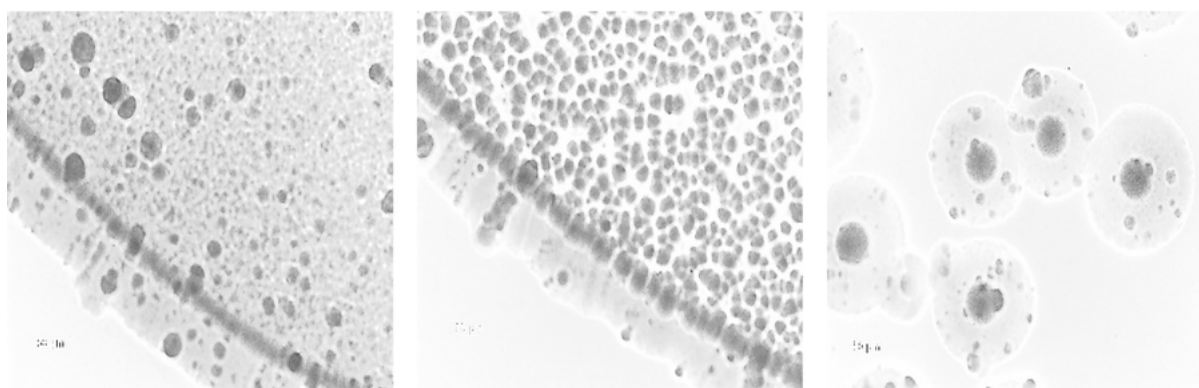
Fonte: Produzido pelo autor.

5 RESULTADOS

5.1 Microrganismos de Referência:

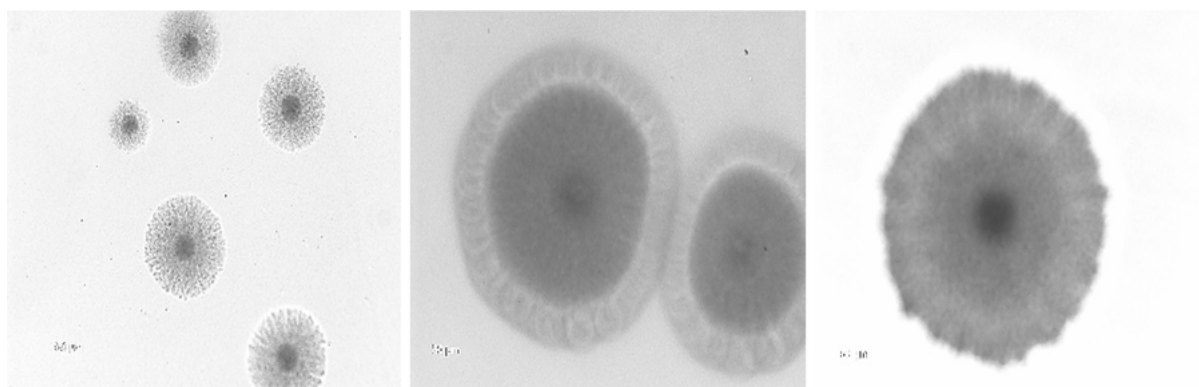
Culturas dos micoplasmas *M. arginini* e *M. orale* e *A. Laidlawii* foram obtidas pelo INCQS/Fiocruz, durante o período da pandemia. O DNA extraído foi avaliado e quantificado pelo Nanodrop® e mostrou-se adequado para a continuação dos ensaios. As concentrações obtidas foram: (*A. laidlawii* - 296,9ng/ μ L); (*M. arginini* - 14,2ng/ μ L); (*M. orale* - 18ng/ μ L). A quantidade de colônias evidenciadas nas placas confirmou a proporção de DNA genômico entre as amostras, ou seja, muito mais colônias por placa/diluição em *A. laidlawii* do que em *M. arginini* e *M. orale* (Figuras 6, 7 e 8). Os marcadores nas imagens são referentes a 50 μ m.

Figura 6 – Fotografias das colônias de micoplasmas obtidas em meio sólido através do plaqueamento de diferentes diluições (10^1 , 10^3 e 10^5) da cultura em caldo de *Acholeplasma laidlawii*



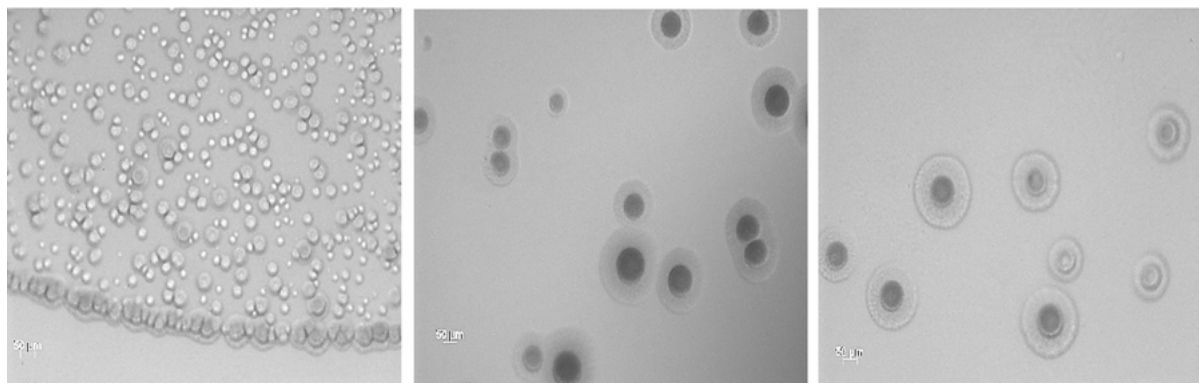
Fonte: Imagens cedidas por Lawson, Rafael - INCQS (Fiocruz)

Figura 7 – Fotografias das colônias de micoplasmas obtidas em meio sólido através do plaqueamento de diferentes diluições (10^1 , 10^3 e 10^5) da cultura em caldo de *Mycoplasma arginini*



Fonte: Imagens cedidas por Lawson, Rafael - INCQS (Fiocruz)

Figura 8 – Fotografias das colônias de micoplasmas obtidas em meio sólido através do plaqueamento de diferentes diluições (10^1 , 10^3 e 10^5) da cultura em caldo de *Mycoplasma orale*



Fonte: Imagens cedidas por Lawson, Rafael - INCQS (Fiocruz)

Com base no valor obtido pela quantificação prévia com o Nanodrop®, foram calculadas as diluições para os primeiros ensaios de PCR digital (ddPCR) já que soluções muito diluídas ou concentradas de DNA não quantificam bem pelo método. A concentração de DNA na preparação de cada microrganismo (em cópias/ μ L) foi obtida utilizando a calculadora *online* DNA Copy Number and Dilution Calculator (Thermo-Scientific), disponível no site <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html>, conforme os resultados apresentados no Quadro 3: *A. laidlawii* – 183.377.613 cópias do gDNA/ μ L; *M. arginini* – 20.075.591 cópias do gDNA/ μ L e *M. orale* – 23.471.226 cópias do gDNA/ μ L.

Quadro 3 – Estimativa de Concentração do gDNA de cada uma das espécies de micoplasmas extraídos

<i>A. laid</i> - INFORMAÇÕES DNA		<i>M. orale</i> - INFORMAÇÕES DNA		<i>M. arginini</i> - INFORMAÇÕES DNA	
Massa molar por pb considerada (g/mol)/bp	650	Massa molar por pb considerada (g/mol)/bp	650	Massa molar por pb considerada (g/mol)/bp	650
Tamanho do fragmento (pb)	1500000	Tamanho do fragmento (pb)	710500	Tamanho do fragmento (pb)	655311
Massa molar (g/mol)	975000000	Massa molar (g/mol)	461825000	Massa molar (g/mol)	952250
Copias/ng	617641	Copias/ng	1303957	Copias/ng	632396955
<i>A. laid</i> - SOLUÇÃO ESTOQUE		<i>M. orale</i> - SOLUÇÃO ESTOQUE		<i>M. arginini</i> - SOLUÇÃO ESTOQUE	
Concentração (ng/ μ l)	296,9	Concentração (ng/ μ l)	18	Concentração (ng/ μ l)	14,2
Copias/ μ l estoque	183377612.89	Copias/ μ l estoque	23471226	Copias/ μ l estoque	20075590.8

Cálculos realizados com a ferramenta online, DNA Copy Number and Dilution Calculator (Thermo-Scientific), disponível no site: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html> a partir dos dados iniciais de quantificação por espectrofotometria em Nanodrop 2000c (Thermo-Scientific) / Fonte: Produzido pelo autor.

5.2 Culturas Celulares:

As culturas celulares utilizadas como controles e matrizes foram previamente testadas e apresentaram resultados negativos pelo método de detecção por bioluminescência (*MycoAlertTM PLUS Mycoplasma Detection kit*, Lonza) (Tabela 2).

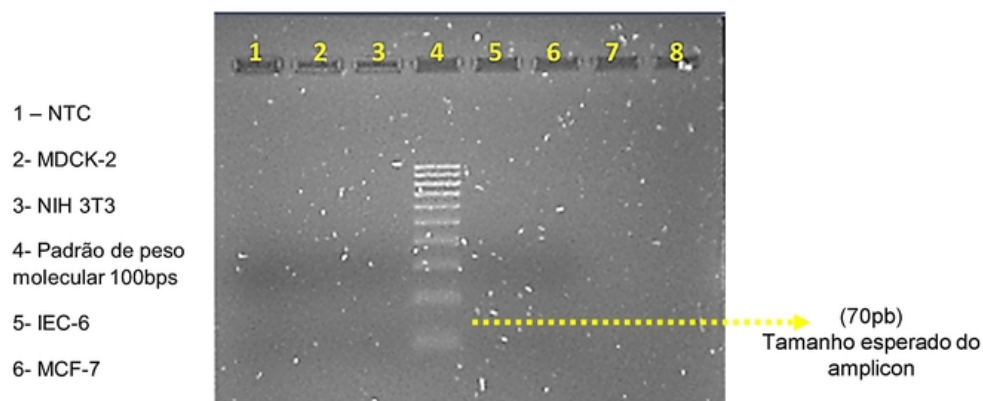
Tabela 2 – Verificação de Ausência de Mycoplasmas nas culturas de células a serem utilizadas como Matrizes, utilizando ensaio bioquímico por bioluminescência *MycoAlertTM PLUS Mycoplasma Detection kit*, Lonza

Controle ou Matriz	Leitura A	Leitura B	Razão de B/A	Interpretação
Controle Negativo	19707	4369	0,22169	Negativo
Controle Positivo	3886	2725499	701,3636	Positivo
MDCK-2	112501	51766	0,46013	Negativo
NIH 3T3	52426	33819	0,64508	Negativo
IEC-6	67028	40946	0,61087	Negativo
MCF-7	149217	79329	0,53163	Negativo

Foram testados os controles positivos e negativos fornecidos pelo Kit e as amostras de sobrenadantes das culturas das células **MDCK-2** (de *Canis familiaris*) em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 1% de aminoácidos não essenciais, 2 mM de L-glutamina, 1,0 g/L de glicose e 10% de soro fetal bovino, **NIH 3T3** (de *Mus musculus*) em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) modificado para conter 2 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose e 10% de soro fetal bovino, **IEC-6** (de *Rattus norvegicus*) em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com L-glutamina 2 mM, 4,5 g/L de glicose, insulina bovina 0,1 Unidade/mL e 5% de soro fetal bovino e **MCF -7** (de *Homo sapiens*) em Meio RPMI-1640 modificado para conter 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 4,5 g/L de glicose e 20% de soro fetal bovino. / Fonte: Produzido pelo Autor.

Confirmada a ausência de micoplasmas nos sobrenadantes das culturas celulares, seus DNA extraídos foram reavaliadas com este fim por PCR, utilizando os pares de iniciadores *Myc_spp_deg* (F e R), apresentando também resultados negativos, demonstrado pela ausência de banda no gel de agarose 3% TAE (figura 9).

Figura 9 – Verificação de Ausência de Mycoplasmas nas Matrizes por PCR utilizando o par de iniciadores Myc_spp_deg (F e R) (RAMOS JUNIOR, 2018)



No gel de agarose 3% em TAE, corado com brometo de etídio, temos: na Canaleta **1 - NTC**, *No Template Control*, sem DNA; **2- DNA extraído de sobrenadante de cultura de células MDCK-2** (de *Canis familiaris*) em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 1% de aminoácidos não essenciais, 2 mM de L-glutamina, 1,0 g/L de glicose e 10% de soro fetal bovino; **3- DNA extraído de sobrenadante de cultura de células NIH 3T3** (de *Mus musculus*) em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) modificado para conter 2 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose e 10% de soro fetal bovino; **4- Padrão de peso molecular**; **5- DNA extraído de sobrenadante de cultura de células IEC-6** (de *Rattus norvegicus*) em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com L-glutamina 2 mM, 4,5 g/L de glicose, insulina bovina 0,1 Unidade/mL e 5% de soro fetal bovino e **6- DNA extraído de sobrenadante de cultura de células MCF -7** (de *Homo sapiens*) em Meio RPMI-1640 modificado para conter 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 4,5 g/L de glicose e 20% de soro fetal bovino. / Fonte: Produzido pelo Autor.

5.3 Confirmação de Identidade dos Microrganismos de Referência:

Os microrganismos cedidos pela UFF obtiveram confirmação da identidade por sequenciamento de DNA realizado no LAMAC usando iniciadores universais para região 16S do rDNA. As análises das sequências consenso das 3 bactérias analisadas apresentaram as sequências das espécies correspondentes como retorno na busca, feita pelo programa BLAST no banco de dados GenBank (disponível www.ncbi.nlm.nih.gov.br) com identidade >99%. Não foram observados *matches* com outras bactérias de espécies filogeneticamente próximas (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Resultados dos Sequenciamentos de DNA dos Microrganismos de Referência oriundos da UFF

Microrganismos de Referência cedidos pela UFF	Sequências de 16S rDNA
<i>M. orale</i>	TCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCCTAATACATGCATGTCGAGCGGAAGTAGCAATACTTTAGCGGCGAATGG GTGAGTAACACGTGCTTAATCTACCTTTTAGATTGGAATACCTAATGGAACATTGGTTAATGCCGGATACGCAT GAAGTCGCATGACTTCGTTGTGAAAGGAGCGTTTGCTCCGCTAAGAGATGAGGGTGCGGAACATTAGCTAGTT GGTGAGGTAATGCCCCACCAAGGCTATGATGTTTAGCCGGGTGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGA GATACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTCCACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCGA CACAGCGTGCACGATGAAGGGCCCTCGGGTTGTAAGTGCTGTTGCAAGGGAAGAAGAGTTAGTTGAGGAAAT GCTTCTAATCTGACGGTACCTTGTTAGAAAGCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTC GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTCTAGGCTGTTTATTAAGTCTGGAGTCAAATCCCAGGG CTCAACCCTGGCTCGCTTTGGATACTGGTAACTAGAGTTAGATAGAGGTAAGCGGAATTCCATGTGGAGCGG TGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAAGGCGAAGGCAGCTTACTGGGTCTATACTGACGCTGAGGGAC GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGATCATTAGTCGGTGGA AAATACTGACGCGCTAACGCATTAAATGATCCGCGCTGAG
<i>M. arginini</i>	TGCATGTCGAGCGAGGTTCTTTGACCTAGCGGCGAATGGGTGAGTAACACGTGCTTMTCTACCTTTAGAT TGAATACCCAATGGAACATTGGCTAATGCCGGATACGCATGGAATCGCATGATTCCGTTGTGAAAGGAGCC YTTAAAGCTCCGCTAGAGGATGAGGGTGCGGAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGACTATG ATGTTTAGCCGGGTGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCA GCAGTAGGGAATATTCCACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCRACACAGCGTGCACGATGAAGGTCTTCGGAT TGTAAGTGCTGTTATAGGGAAGAAGACACCTGGTTGAGGAAATGCTTCCAGGCTGACGGTACCCTGTCAGAAA GCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA AAGCGTTCTGAGGCTGTTTATTAAGTCTGGAGTCAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGCTCGCTTTGGATACTGGT AAATAAGGTTAGATAGAGGTAAGCGGAATCCATGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCA AAGGCGAAGGCAGCTTACTGGGTCTATACTGACGCTGAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCATT
<i>A. laidlawii</i>	TGCANGTCGNACGAAGCATCTTCGGATGCTTAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGATAACCTACCTTTAAC TCGAGGATAACTCCGGGAAACTGGAGCTAATACTGGATAGGATGTGTGCATGAAAAAACACATTTAAAGATTT ATCGGTTTAAAGAGGGGTCTGCGGCGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGCCTACCAAGACGATGATGCGTAG CCGGACTGAGAGGTCTACCGGCCACATTGGGACTGAGAACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGG GAATTTTCGGCAATGGGGGAAACCCTGACCGAGCAACGCCGCTGAACGACGAAGTACTTCGGTATGTAAAGT TCTTTTATATGGGAAGAAAAATTAATAATTGACGGTACCATATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGC CGCGGTAATACATAGGGGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGTGCAGTAGGTGGTTATAAAG TTTGTGGTGTAAAGTGCAAGTGCTTAACGCTGTGAGGCTATGAAACTATATACTAGAGTGAGACAGAGGCAAGT GGAATTCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAAGTGCGGAAGGCGGCTTGCTGGGTC TATACTGACACTGATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG ATGAGAACTAAGTGTTGGCCAAAAGGTCAGTGCTGCAGTTAACGCANTAA

Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 4 – Detalhes sobre as buscas por sequências similares realizadas com o programa BLAST no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.br>) para a confirmação de identidade dos Microrganismos de Referência Cedidos pela UFF

Amostra	Sequência Consenso Pós Análise (bp)	Identidade Satisfatória com Espécie Correspondente (%)	Iniciadores	Número de Match Satisfatório com a Espécie Correspondente	Número de Match Satisfatório com Espécie não Correspondente
<i>M. orale</i>	845	100	27F 907R	6	0
<i>M. arginini</i>	764	99,35	27F 907R	13	0
<i>A. laidlawii</i>	782	100	27F 907R	17	0

Fonte: Produzido pelo autor.

As amostras de referência cedidas pelo INCQS-Fiocruz, foram sequenciadas pela Agrega Biotec usando iniciadores universais para região 16S do rDNA, com ID de amostra: SALA (Sequencia de *A. laidlawii*), SORA (Sequencia de *M. orale*) e SARG (Sequencia de *M. arginini*), apresentando similaridade com a espécie correspondente esperada, confirmando identidade (Tabelas 5e 6).

Tabela 5 – Resultados dos Sequenciamentos de DNA dos Microrganismos de Referência oriundos do INCQS.

Microrganismos de Referência cedidos pelo INCQS-Fiocruz	Sequências de 16S rDNA
<i>M. orale</i>	CTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCCTAATACATGCATGTCGAGCGGAAGTAGCAATACTTTAGCGGCGAATG GGTGAGTAACACGTGCTTAATCTACCTTTTAGATTGGAATACCTAATGGAACATTGGTTAATGCCGGATACGCA TGAAGTCGCATGACTTCGTTGTGAAAGGAGCGTTTGTCTCCGCTAAGAGATGAGGGTGCGGAACATTAGCTAGT TGGTGAGGTAATGGCCACCAAGGCTATGATGTTTAGCCGGGTCGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTG AGATACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATCCACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCGA CACAGCGTGCACGATGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGTGCTGTTGCAAGGGAAGAACAGTTAGTTGAGGAAAT GCTTCTAATCTGACGGTACCTTGTAGAAAGCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGTC GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTATTAAGTCTGGAGTCAAAATCCCAGGG CTCAACCTGGCTCGCTTTGGATACTGGTAAACTAGAGTTAGATAGAGGTAAGCGGAATCCATGTGGAGCGG TGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAAAGGCGAAGGCAGCTTACTGGGTCTATACTGACGCTGAGGGAC GAAAGCGTGAGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGATCATTAGTCGGTGGA AACTACTGACGCAGCTAACGCATTAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGGAAT TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTGAAGATACGCGGAGAACCTTACCCACTCTTG ACATCCCCTGCAAGCTATAGAGATATAGTAGAGTTAACAGGGTGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTGACGT CGTGTCTGAGATGTTTGGTCAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTACTAACGAGTCATGTCGA GGAATCTAGAGATACTGCCTGGGTAAACGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCTCTTACGA GTGGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTACAAAGAGAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAATCTCAAAA GCCGATCTCAGTTCGAGTTGAAGTCTGCAATTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCT ACGCTGCGGTGAATACGTTCTCGGGTCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCTGGTAATACCCAAAG TCGGTTTGCTAACCTCGGAGGCGACTGCCTAAGGTAGGACTGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAC CGTAA
<i>M. arginini</i>	TTATGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCCTAATACATGCATGTCGAGCGAGGTTCTTTGAACCTAGCGGC GAATGGGTGAGTAACACGTGCTTAATCTACCTTTAGATTGGAATACCAATGGAACATTGGCTAATGCCGGA TACGCATGGAATCGCATGATTCCGTTGTGAAAGGAGCCYTTAAAGCTCCGCTAGAGGATGAGGGTGCGGAACA TTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGACTATGATGTTTAGCCGGGTCGAGAGACTGAACGGCCACAT TGGGACTGAGATACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTCACAAATGAGCGAAAGCTTGA TGGAGCRACACAGCGTGCACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTGCTGTTATAGGGAAAGAACACCTGGTTG AGGAAATGCTTCCAGGCTGACGGTACCCTGTGAGAAAGCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA CATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTATTAAGTCTGGAGTCAAA TCCCAGGGCTCAACCCTGGCTCGCTTTGGATACTGGTAACTAGAGTTAGATAGAGGTAAGCGGAATCCATGT GAAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAAAGGCGAAGGCAGCTTACTGGGTCTATACTGACGCT GAGGGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATCATTAGT CGGTGGAGAGTTCACTGACGCAGCTAACGCATTAAATGATCCGCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAACT TAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTGAAGATACGCGGAGAACCTTAC CCACTCTTGACATCCTTCGCAATGCTATAGAGATATAGCGGAGGTTAACGGAGTGACAGATGGTGCATGGTTGT CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTTGGTCAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTACTAACGAGT CATGCTGAGGACTCTAGAGATACTGCCTGGTAACTGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCT CTTACGAGTGGGGCAACACACGTGCTACAATGGTACTGACAAAGAGAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAAATC TCAAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAATTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAG ATCAGCTACGCTGCGGTGAATACGTTCTCGGGTCTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCTGGTAATA CCCAAAGTCGGTTAGCTAACCTCGGAGGCGACCGCCTAAGGTAGGACTGGTGAAGTCGTAACA GGGTAACCCG
<i>A. laidlawii</i>	ATTTCCCGTGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAAGCATCTTCGGATGCT TAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGATAACCTACCTTTAACTCGAGGATAACTCCGGGAACTGGAGCTA ATACTGGATAGGATGTGTGCATGAAAAAACACATTTAAAGATTATCGGTTTAAAGGGGTCTGCGGCGCATT AGTTAGTTGGTGGGGTAAAGCCTACCAAGACGATGATGCGTAGCCGGACTGAGAGGTCTACCGGCCACATT GGGACTGAGAACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGCAATGGGGGAAACCTGAC CGAGCAACGCCGCTGAACGACGAAGTACTTCGGTATGTAAGTTCTTTTATATGGGAAGAAAAATTTAAAT GACGGTACCATATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCGAGCGTTA TCCGGATTACTGGGCGTAAAGGGTGCCTAGGTGGTTATAAAAGTTTGTGGTGAAGTGCAGTGCTTAACGCT GTGAGGCTATGAAACTATATAACTAGAGTGAGACAGAGGCAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTAAATGCGT AAATATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTTGTGGGTCTATACTGACACTGATGCACGAAAGCGTG GGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGAAGTAAAGTGTGGCCAAAGGTC AGTGCTGCAGTTAACGCATTAAAGTTCTCCGCTGAGTAGTACGTACGCAAGTACGCAAGTAAAGGATGACG GGACCCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACAGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATAC TCTGCAAGGCTTAGAAATAAGTTCTGGAGGCTAACAGATGTACAGGTGGTGCACGGTTGTCTGTCAGCTCGTGT CGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGCTAGTTACCATCATTAAAGTTGGGACTCT AGCGAGACTGCCAGTGATAAATGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTTATGGGC TACAAACGTGATACAATGGCTGGAACAAAGAGAAGCGATAGGGTGACCTGGAGCGAAACTCACAAAAACGTC TCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAATCAGCATGTTGCG GTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAAAACACGAAAGTGGGCAATACCAACGCGCGTGGC CTAACCCGAAAGGGAGGGAGCCGCTAAGGTAGGGTCCATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAGGTAACCGTAA

Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 6 – Detalhes sobre as buscas por sequências similares realizadas com o programa EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>) para a confirmação de identidade dos Microrganismos de Referência Cedidos pelo INCQS-Fiocruz. Amostras: SALA (Sequencia de *A. laidlawii*) , SORA (Sequencia de *M. orale*) e SARG (Sequencia de *M. arginini*)

Amostra	Espécie mais próxima ¹	Similaridade	Gênero ²
SALA	<i>Acholeplasma laidlawii</i> ATCC 23206 (U14905)	99,44%	<i>Acholeplasma</i>
SORA	<i>Mycoplasma orale</i> ATCC 23714 (ATUH01000005)	100,00%	<i>Mycoplasma</i>
SARG	<i>Mycoplasma arginini</i> G230 (AF125581)	100,00%	<i>Mycoplasma</i>

¹ Códigos de acesso são apresentados entre parênteses.

² Considerando 94,5% como o limiar de similaridade para a identificação de gêneros de bactérias (Yarza et al., 2014).

Fonte: Adaptado de AgregaBiotec

Adicionalmente à análise das sequências, foi feita análise filogenética das amostras em que se concluiu que: SALA pode ser considerada como pertencente ao gênero *Acholeplasma*, sendo SORA e SARG consideradas como pertencentes ao gênero *Mycoplasma*. SORA foi agrupada com *Mycoplasma orale* e *Mycoplasma indienne*, e SARG foi agrupada com *Mycoplasma arginini*, indicando proximidade com essas espécies (Figura 10).

Figura 10 – Cladograma da Análise Filogenética das amostras SALA (Sequência de *A. laidlawii*), SORA (Sequência de *M. orale*) e SARG (Sequência de *M. arginini*).



Cladograma inferido por Máxima Verossimilhança das sequências do gene codificador do 16S rRNA. Os códigos de acesso das sequências (ncbi.nlm.nih.gov/genbank) são mostrados após a descrição dos nomes e linhagens das espécies bacterianas. Os círculos pretos nos pontos de ramificação indicam valores de *bootstrap* > 70%. Árvores baseadas em um único marcador filogenético tendem a ter ramos com baixos valores de *bootstrap* (Klenk e Göker, 2010) / Fonte: Adaptado de AgregaBiotec

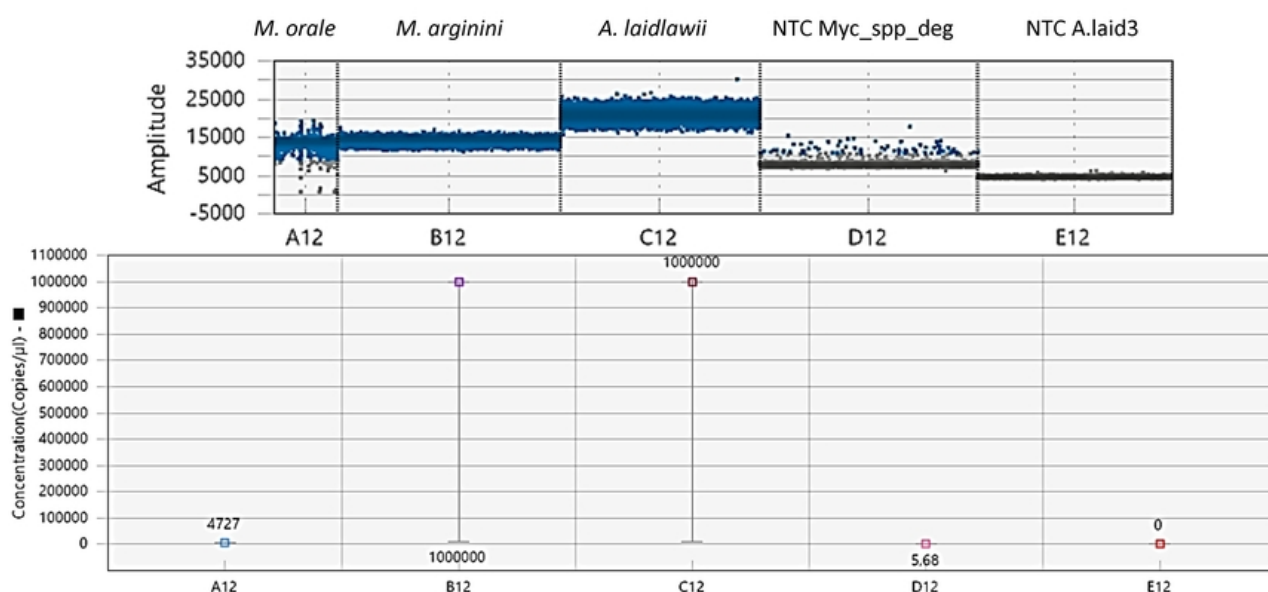
5.4 Extração do DNA Genômico e Desenvolvimento de Padrões e Controles:

Com a identidade das espécies confirmadas por sequenciamento, partimos para o desenvolvimento dos padrões de DNA das diferentes espécies de micoplasmas a fim de utilizá-los como referência nos ensaios de seletividade e limite de detecção. As quantificações absolutas do DNA nesses padrões foram feitas por ddPCR com os pares de iniciadores Myc_spp_deg (F e R) e A. laid3 (F e R), estabelecendo a concentração em cópias/μL.

No processo de quantificação, foram aceitas apenas as reações ddPCR com formação de pelo menos 10 mil micelas e 30-60% das micelas positivas, de modo a minimizar os erros de subamostragem e particionamento (BASU, 2017).

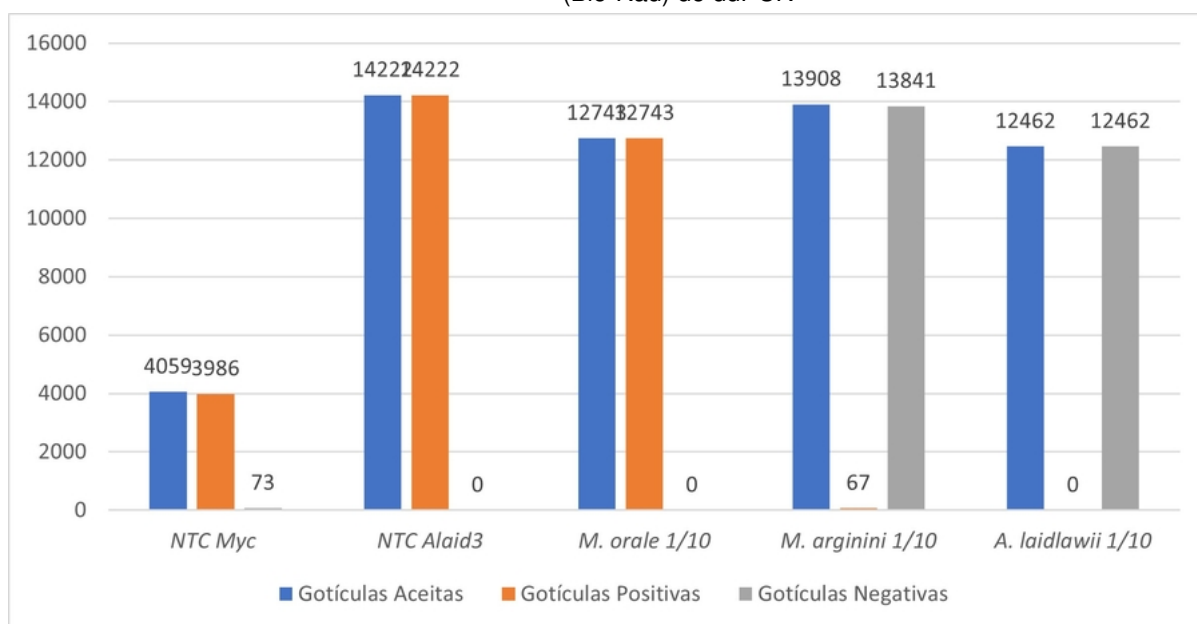
O primeiro ensaio de ddPCR (Figura 11), teve como propósito a quantificação inicial, tomando como base a estimativa de concentração obtida por Nanodrop®. Este ensaio foi realizado utilizando 3 µL de uma diluição de 1/10 das preparações de DNA extraído de cada um dos microrganismos de referências cedidas pelo INCQS-Fiocruz. O resultado obtido não foi satisfatório, pois houve saturação de gotículas positivas por excesso de DNA, impedindo a quantificação (Gráfico 1).

Figura 11 – Primeira Quantificação dos padrões de DNA das diferentes espécies de micoplasmas por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/µL de reação das diluições 1/10 dos diferentes dos padrões: *M. orale*, *M. arginini* e *A. Laidlawii*. Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR



Amostras: A12) *M. orale* 1/10 com iniciadores Myc_spp_deg; B12) *M. arginini* 1/10 com iniciadores Myc_spp_deg; C12) *A. Laidlawii* 1/10 com iniciadores A.laid3; D12) NTC (no template control) com iniciadores Myc_spp_deg; E12) NTC (no template control) com iniciadores A.laid3. / Fonte: Produzido pelo autor

Gráfico 1 – Apresentação do número de eventos positivos, negativos e totais em cada amostra da Primeira Quantificação dos Padrões de DNA. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR



Fonte: Produzido pelo autor.

Tendo em mente que na quantificação das diluições 1/10 das preparações de DNA de cada espécie (Figura 11) houve saturação com esferas positivas, novos cálculos de diluição foram elaborados tomando também como base a quantificação inicial feita por espectrofotometria, visando obter como leitura final da ddPCR 20 mil cópias nos 20 μ L de reação ou 1.000 cópias/ μ L de reação. Para tanto, preparamos para cada uma das soluções de DNA uma diluição contendo aproximadamente 6.666cp/ μ L e, desta, utilizamos 3 μ L por reação de ddPCR (cálculos na Figura 12 e resultados da quantificação por ddPCR na Figura 13).

Figura 12 – Cálculo das novas diluições dos padrões de DNA das diferentes espécies de micoplasmas para Quantificação absoluta por ddPCR. De cada, foram preparadas soluções com concentração 6.666 cópias/ μ L (conforme dados de espectrofotometria), aplicando-se por reação 3 μ L de amostra. Desta forma, espera-se que cada diluição apresente 20.000 cópias nos 20 μ L de reação de ddPCR.

<i>A. laid</i> - DILUIÇÃO	
Concentração desejada (cp/ μ L)	6666

Para ter 20mil cp em 20 μ L de reação

$$\begin{array}{ll}
 \text{DIL 1 - } C1.V1 = C2.V2 & \text{3}\mu\text{L DNA} \\
 183377612.89 \times 3 = C2 \times 1000 & \text{amostra mãe} \\
 55.013.283,87 & \text{997}\mu\text{L H}_2\text{O} \\
 & \downarrow \\
 \text{DIL 2 - } C1.V1 = C2.V2 & \text{3}\mu\text{L DNA DIL 1} \\
 55.013.283,867 \times 3 = C2 \times 1000 & \text{997}\mu\text{L H}_2\text{O} \\
 165.039,85 & \downarrow \\
 \text{DIL 3 - } C1.V1 = C2.V2 & \text{20}\mu\text{L DNA DIL 2} \\
 165039,85 \times 20 = 6666 \times V2 & \text{475,16}\mu\text{L H}_2\text{O} \\
 495,16 &
 \end{array}$$

<i>M. orale</i> - DILUIÇÃO	
Concentração desejada (cp/ μ L)	6666

Para ter 20mil cp em 20 μ L de reação

$$\begin{array}{ll}
 \text{DIL 1 - } C1.V1 = C2.V2 & \text{3}\mu\text{L DNA} \\
 23471226 \times 3 = C2 \times 1000 & \text{amostra mãe} \\
 70.413,68 & \text{997}\mu\text{L H}_2\text{O} \\
 & \downarrow \\
 \text{DIL 2 - } C1.V1 = C2.V2 & \text{3}\mu\text{L DNA DIL 1} \\
 70413,678 \times 3 = 6666 \times V2 & \text{28,69}\mu\text{L H}_2\text{O} \\
 31,69 &
 \end{array}$$

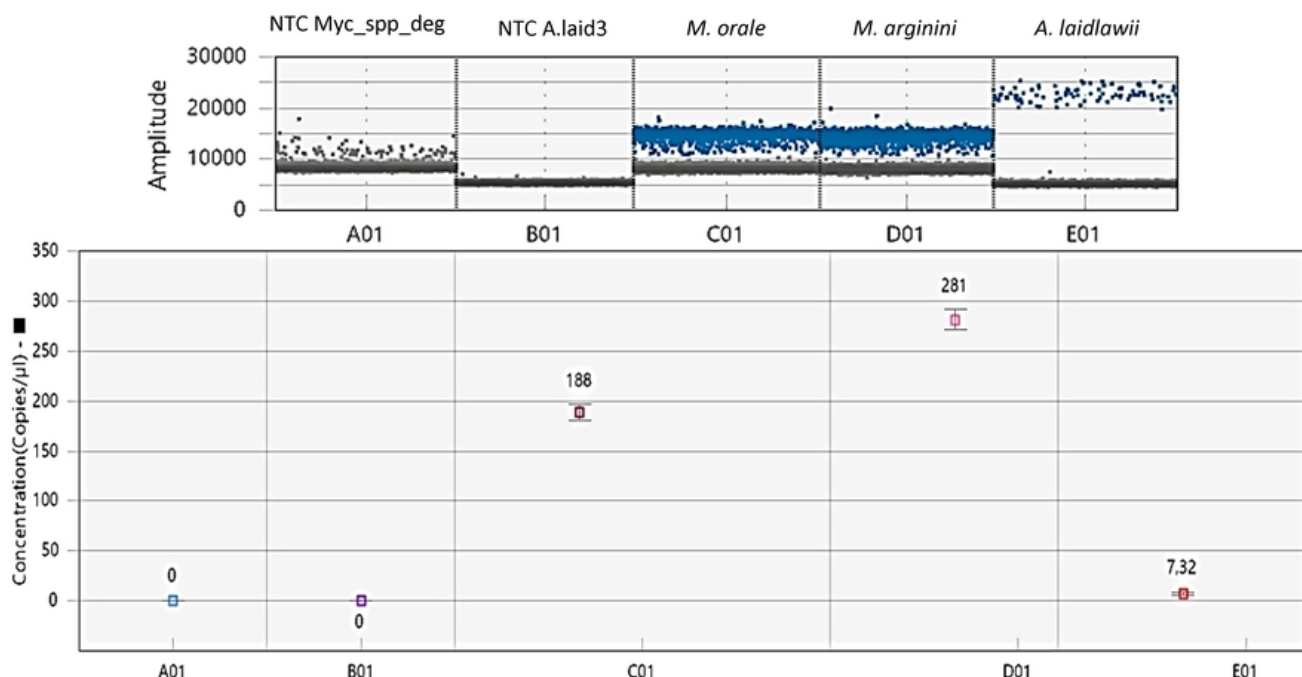
<i>M. arginini</i> - DILUIÇÃO	
Concentração desejada (cp/ μ L)	6666

Para ter 20mil cp em 20 μ L de reação

$$\begin{array}{ll}
 \text{DIL 1 - } C1.V1 = C2.V2 & \text{2}\mu\text{L DNA} \\
 20075590.8 \times 2 = C2 \times 1000 & \text{amostra mãe} \\
 40.151,18 & \text{998}\mu\text{L H}_2\text{O} \\
 & \downarrow \\
 \text{DIL 2 - } C1.V1 = C2.V2 & \text{10}\mu\text{L DNA DIL 1} \\
 40.151,18 \times 10 = 6666 \times V2 & \text{50,23}\mu\text{L H}_2\text{O} \\
 60,23 &
 \end{array}$$

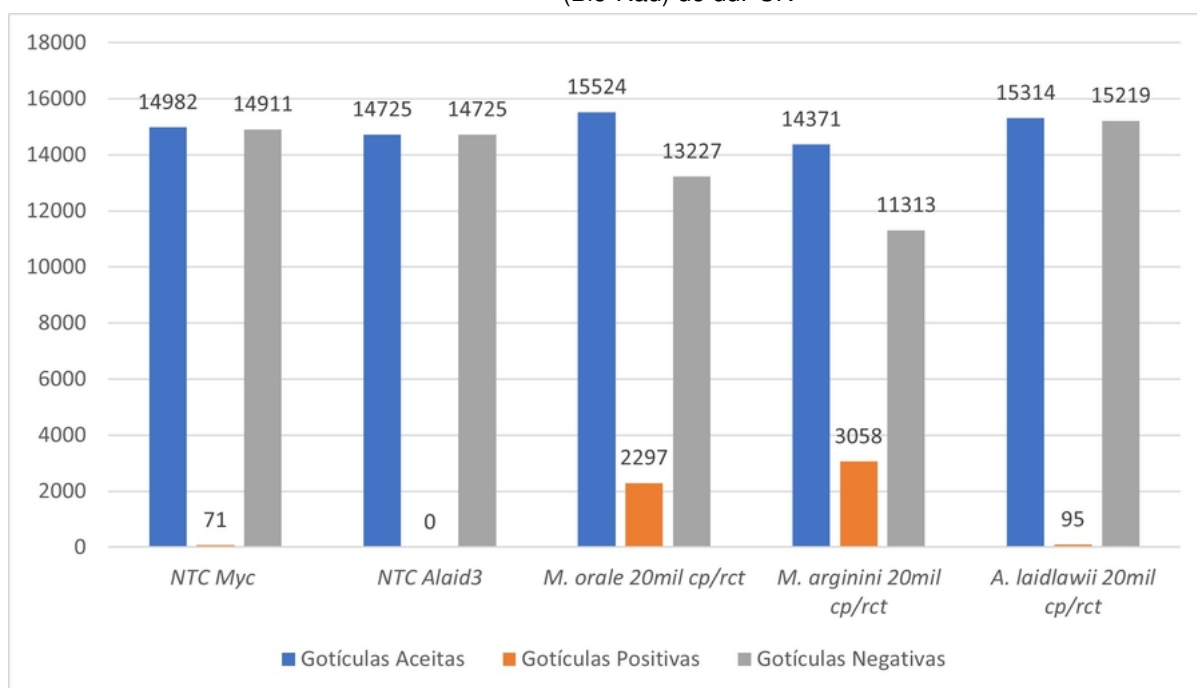
Observação: Estas novas diluições foram preparadas buscando evitar a saturação das reações de ddPCR com gotículas positivas, de forma a permitir uma quantificação adequada. / Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 13 – Segunda Quantificação dos padrões de DNA das diferentes espécies de micoplasmas por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/μL de reação das diluições dos diferentes dos padrões: *M. orale*, *M. arginini* e *A. laidlawii*. Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR.



Amostras: A01) NTC (*no template control*) com iniciadores Myc_spp_deg; B01) NTC (*no template control*) com iniciadores A.laid3; C01) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 1.000 cópias/μL de reação (tomando como base quantificação por espectrofotometria), utilizando iniciadores Myc_spp_deg; D01) Preparação de DNA de *M. arginini* com expectativa de conter 1.000 cópias/μL de reação (tomando como base quantificação por espectrofotometria), utilizando iniciadores Myc_spp_deg; E01) Preparação de DNA de *A. laidlawii* com expectativa de conter 1.000 cópias/μL de reação (tomando como base quantificação por espectrofotometria), utilizando iniciadores A.laid3. / Fonte: Produzido pelo autor.

Gráfico 2 – Apresentação do número de eventos positivos, negativos e totais em cada amostra da Segunda Quantificação dos Padrões de DNA. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR



Fonte: Produzido pelo autor.

Por ddPCR, foi observada uma concentração de cópias/ μ L de reação inferior à estimada inicialmente por espectrofotometria em Nanodrop®. Os valores obtidos pela técnica de referência de quantificação absoluta de ácidos nucleicos, a PCR digital, foram as consideradas a partir desta etapa na caracterização de um lote de padrões de DNA dos Microrganismos de referência, conforme apresentados na Tabela 7, abaixo.

Tabela 7 – Resultados da quantificação absoluta por ddPCR dos padrões de DNA de diferentes espécies de micoplasmas

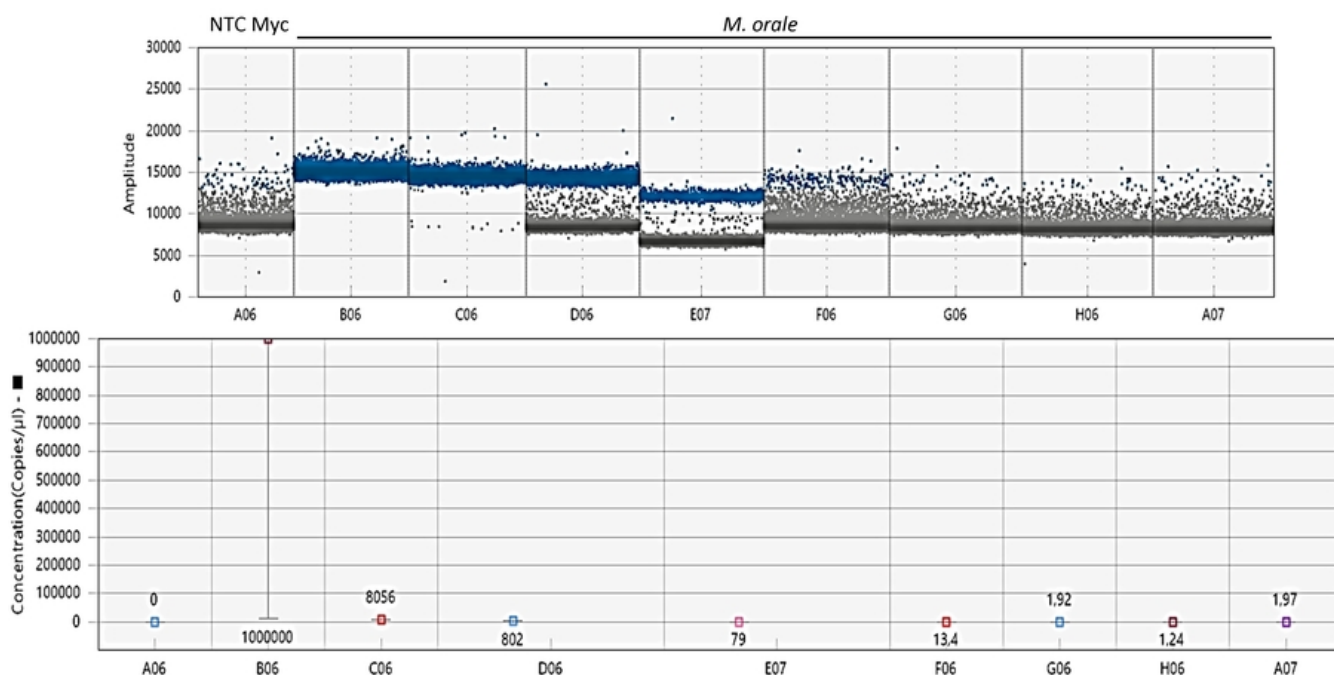
DNA	ddPCR	ddPCR	Diluição	Diluição	Fator de diluição	Solução mãe
	Cópias/ μ L de reação	Cópias/20 μ L de reação	Cópias/3 μ L da diluição	Cópias/ μ L da diluição		Cópias/ μ L
<i>A. laidlawii</i>	7,32	146,4	146,4	48,7	2.750.560,90	13.176.315
<i>M. orale</i>	188	3.760	3.760	1.253,30	3.520,70	4.412.493
<i>M. arginini</i>	281	5.620	5.620	1.873,30	3.011,50	5.641.443

Fonte: Produzido pelo autor.

A partir desses padrões, foi possível preparar diluições com concentração conhecida de DNA, para testar por PCR e estabelecer o Limite de detecção dos ensaios em validação neste trabalho. A curva de diluição apresentada a seguir (Figura 14) foi idealizada de forma preliminar, que auxiliou no entendimento sobre o funcionamento do iniciador myc_spp_deg, as diferenças e perdas/degradação do gDNA no tubo estoque e limitações do ddPCR

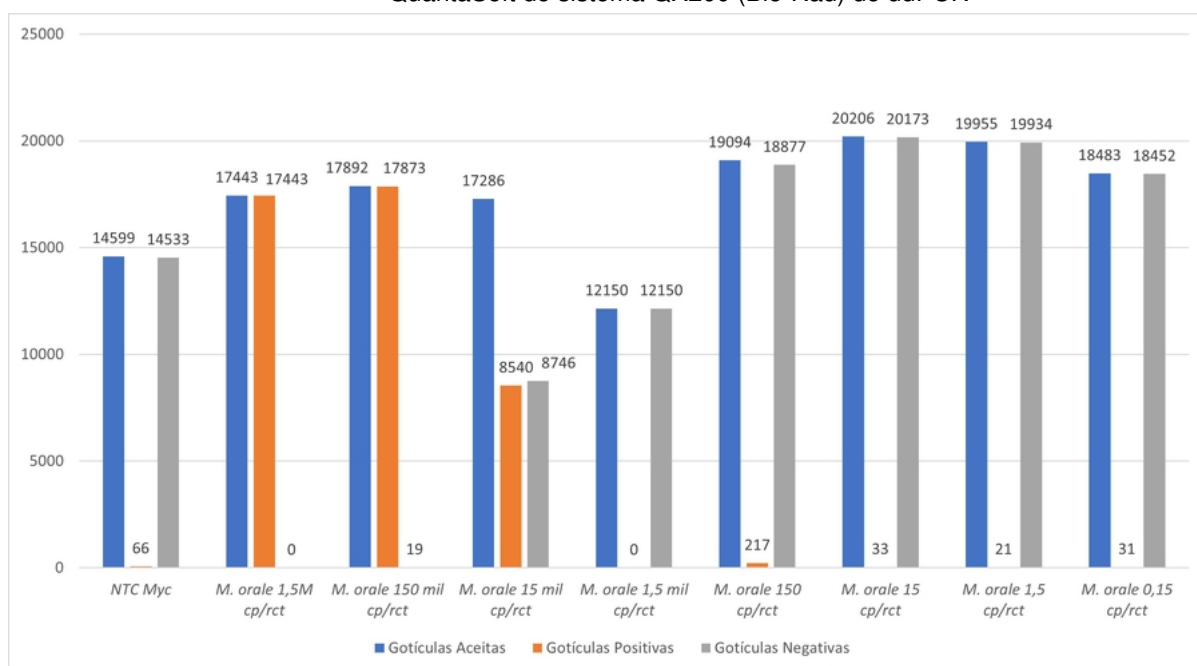
(Gráfico 3). Por meio destas definições, foi preparada a curva dos ensaios de limite de detecção do *M. orale*; já a produzida para *A. laidlawii* (Figura 15)(Gráfico 4) foi definida logo como a definitiva.

Figura 14 – Quantificação de diluições do padrão de DNA de *Mycoplasma orale* por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/uL de reação das diluições do padrão em caracterização. Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR.



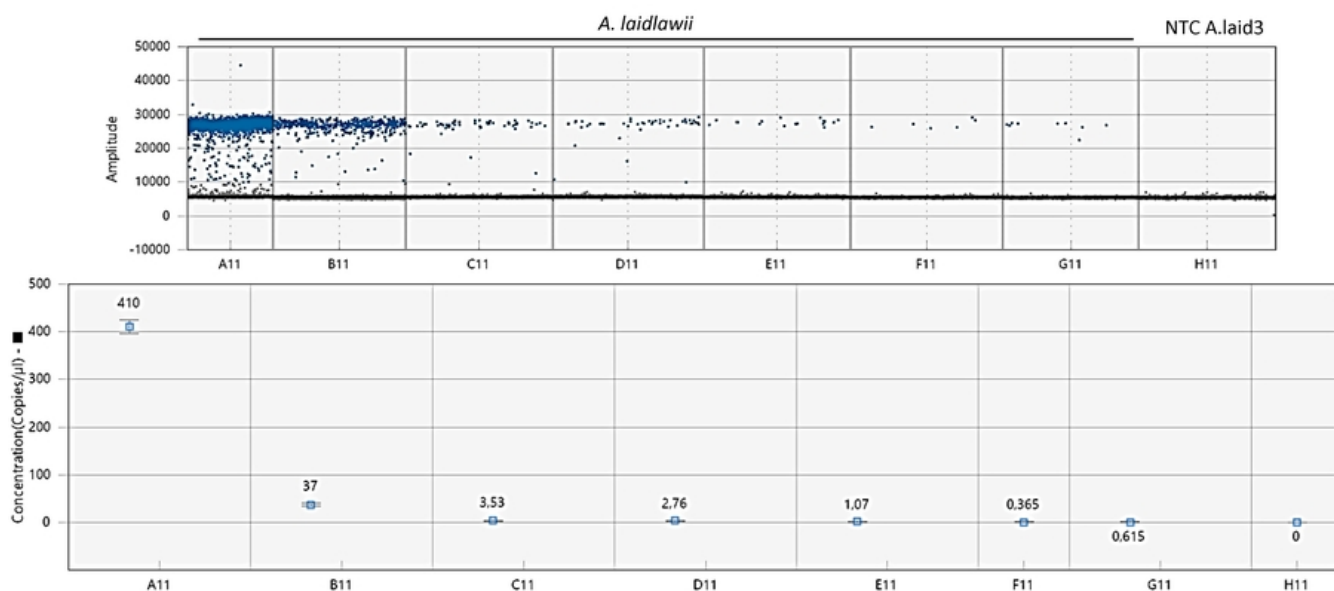
Amostras: A06) NTC (*no template control*) com iniciadores Myc_spp_deg; B06) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 1.500.000 cópias em 20μL de reação; C06) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 150.000 cópias em 20μL de reação; D06) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 15.000 cópias em 20μL de reação; E07) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 1.500 cópias em 20μL de reação; F06) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 150 cópias em 20μL de reação; G06) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 15 cópias em 20μL de reação; H06) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 1,5 cópias em 20μL de reação; A07) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 0,15 cópias em 20μL de reação / Fonte: Produzido pelo autor

Gráfico 3 – Apresentação do número de eventos positivos, negativos e totais em cada amostra da Quantificação dos Padrões de DNA de *Mycoplasma orale*. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR



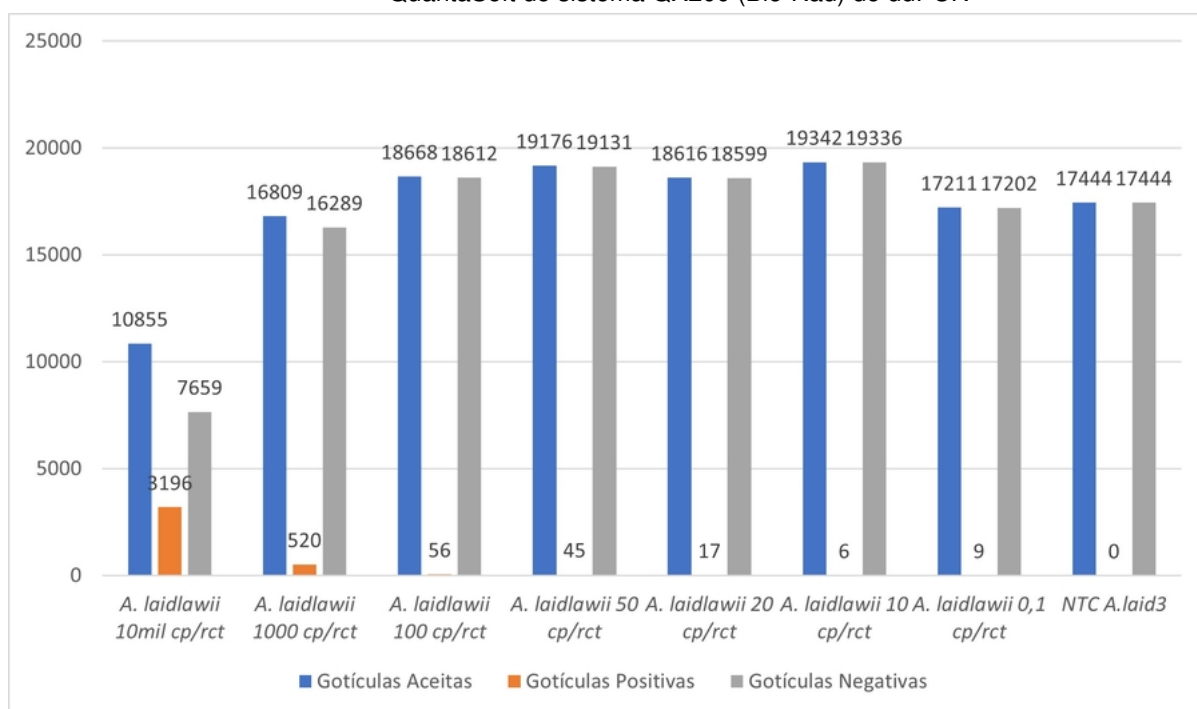
Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 15 – Quantificação de diluições do padrão de DNA de *Acholeplasma laidlawii* por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/uL de reação das diluições do padrão em caracterização. Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR.



Amostras: A11) Preparação de DNA de *A. laidlawii* com expectativa de conter 10.000 cópias em 20μL de reação; B11 Preparação de DNA de *A. laidlawii* com expectativa de conter 1.000 cópias em 20μL de reação; C11) Preparação de DNA de *A. laidlawii* com expectativa de conter 100 cópias em 20μL de reação; D11) Preparação de DNA de *A. laidlawii* com expectativa de conter 50 cópias em 20μL de reação; E11) Preparação de DNA de *A. laidlawii* com expectativa de conter 20 cópias em 20μL de reação; F11) Preparação de DNA de *A. laidlawii* com expectativa de conter 10 cópias em 20μL de reação; G11) Preparação de DNA de *A. laidlawii* com expectativa de conter 0,1 cópias em 20μL de reação; H11) NTC (*no template control*) com iniciadores A.laid3 /Fonte: Produzido pelo autor.

Gráfico 4 – Apresentação do número de eventos positivos, negativos e totais em cada amostra da Quantificação dos Padrões de DNA de *Acholeplasma laidlawii*. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR



Fonte: Produzido pelo autor.

Vale ressaltar que a faixa ótima de trabalho, ou seja, as quantificações mais precisas pelo ddPCR ocorrem em uma faixa de 30%-60% de micelas positivas. Durante a análise dos resultados, constatamos que a única amostra que seguiu esse critério, foi a diluição 1/100 com valor estimado de 15.000 cópias em 20µL de reação, (Tabela 8).

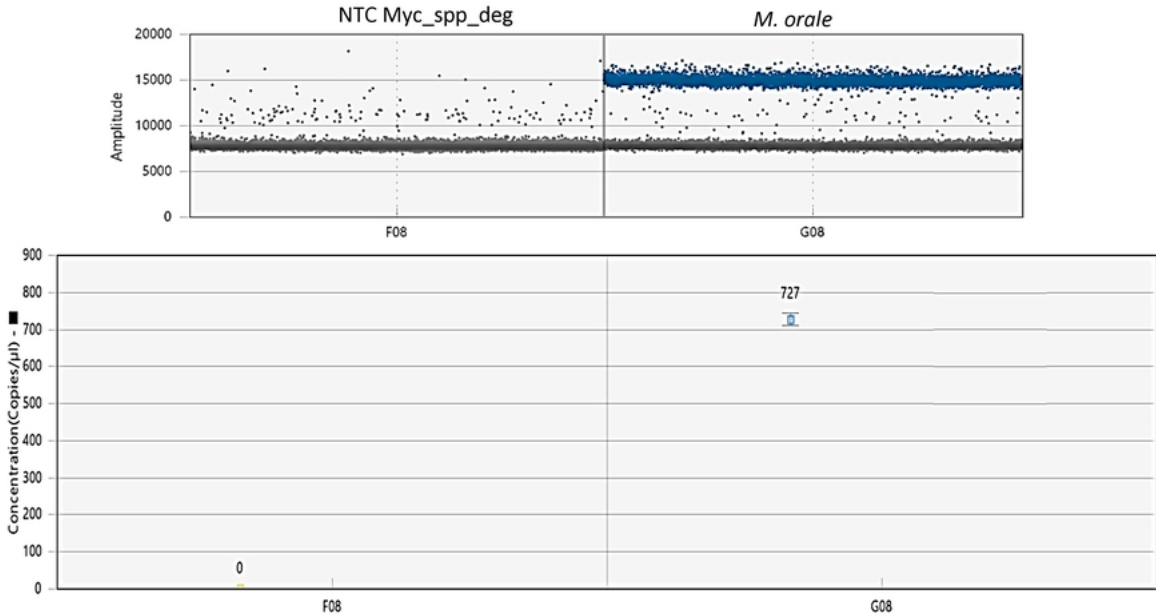
Tabela 8 – Resultados da quantificação absoluta por ddPCR dos padrões de DNA de *Mycoplasma orale* com valores de correção e porcentagem de gotículas positivas. Dados obtidos pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR

Diluição	Conc Teórica	Conc (cp/ul)	Vol rct (ul)	(F) Fator Dil	x 20 / 3 x (F)	Droplets aceitas	Droplets Pos (%)
1	1,5M cp/rct	1000000	20	1/ 8,82	58.800.000	17.443	100%
1/10	150.000 cp/rct	8056	20	1/ 88,2	4.736.928	17.892	99,89%
1/100	15.000 cp/rct	802	20	1/ 882	4.715.760	17.286	49,40%
1/ 3.333	20.000 cp/rct	188	20	1/ 3.177	3.981.840	15.524	14,80%
1/ 1.000	1.500 cp/rct	79	20	1/ 8.820	1.117.200	18.933	6,49%
1/ 10.000	150 cp/rct	13,4	20	1/ 88.200	7.879.200	19.094	1,14%
1/ 100.000	15 cp/rct	1,92	20	1/ 882.000	11.289.600	20.206	0,16%
1/ 1M	1,5 cp/rct	1,24	20	1/ 8.820.000	72.912.000	19.955	0,1%

Fonte: Produzido pelo autor.

Estas análises demandaram alguns dias, e para se ater a quantificação mais precisa de *M. orale* (pois há degradação do DNA ou perda para as paredes do tubo), incluímos mais um ensaio com ddPCR preliminar. A reavaliação evidenciou que houve alteração de 802cp/µL para 727cp/µL (Figura 16). A partir desta amostra, foi concluída a curva de diluição definitiva para *M. orale* (Tabela 9).

Figura 16 – Quantificação de diluição do padrão de DNA de *Mycoplasma orale* por ddPCR. Acima, representação das populações de gotículas positivas (em azul) e negativas (em cinza) em cada amostra. Abaixo, quantificação cópias/uL de reação da diluição do padrão em caracterização. Imagens geradas pelo programa QuantaSoft do sistema QX200 (Bio-Rad) de ddPCR.



Amostras: F08) NTC (*no template control*) com iniciadores Myc_spp_deg; G08) Preparação de DNA de *M. orale* com expectativa de conter 15.000 cópias em 20µL de reação /Fonte: Produzido pelo autor

Tabela 9 – Cálculo das novas diluições do padrão quantificado por ddPCR de DNA de *Mycoplasma orale* para curva de diluição seriada a ser utilizada para Limite de detecção preliminar e Limite de detecção definitivo

ddPCR M.orale = 727 x 20 = 14.540 cp/rct
14.540 cp/rct ÷ 3 = 4.846,66 cp/ul

DIL 1 -	$C1.V1 = C2.V2$ $4.846,66 \times V1 = 3.333,33 \times 50$ $V2 = 166.666,5 / 4.846,66 = 34,38$ DNA	50ul
	10.000 cp/rct PCR com 3ul	
DIL 2 -	5ul DNA DIL 1 - 45ul H2O	1.000
DIL 3 -	5ul DNA DIL 2 - 45ul H2O	100
DIL 4 -	5ul DNA DIL 3 - 45ul H2O	10
DIL 5 -	25ul DNA DIL 4 - 25ul H2O	5
DIL 6 -	5ul DNA DIL 4 - 45ul H2O	1
DIL 7 -	5ul DNA DIL 6 - 45ul H2O	0,1

Fonte: Produzido pelo autor

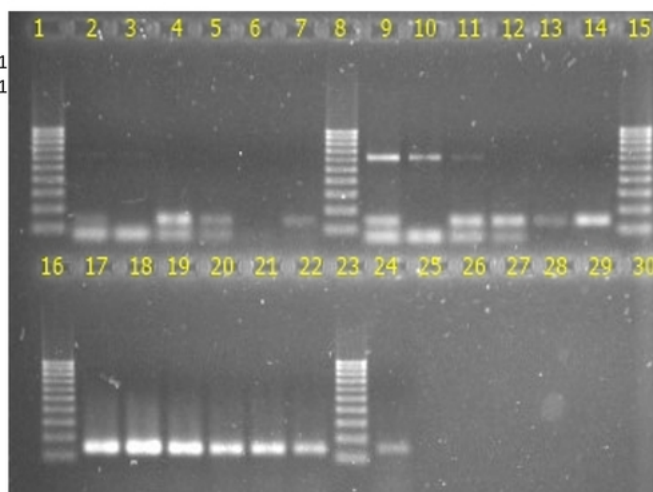
5.5 Ensaios de validação da PCR:

5.5.1 Seletividade:

Os testes de seletividade foram feitos utilizando uma reação multiplex com Iniciadores Myc_spp_deg (F e R) e A.laid3 (F e R). Foi observado, no entanto, presença de *amplicons* com alturas de banda inespecíficas, talvez por função de alguma interação entre os iniciadores myc_spp_deg e A. laid3 com o DNA genômico alvo na amostra (Figura 17). Assim, as análises de seletividade passaram a ser executadas somente com os iniciadores de *Acholeplasma laidlawii* em singleplex (Figura 18). Houve amplificação específica desse microrganismo sem interferência da matriz nas concentrações de 1.000 cópias em 20µL de reação e 10 cópias em 20µL de reação. A seletividade com bactérias filogeneticamente próximas foi realizada durante a dissertação de Ramos Junior (2018) (Figura 19) é mostrado que a reação de PCR consegue amplificar outras bactérias, no entanto, num padrão de banda diferente. A banda definida para *A.laidlawii* é de aproximadamente 148pb e 70pb para os demais Micoplasmas.

Figura 17 – Produtos da PCR desenvolvida com iniciadores Myc_spp_deg e A.laid3 (Multiplex) de *M. orale*, *M. arginini* e *A. laidlawii* com diferentes matrizes, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%

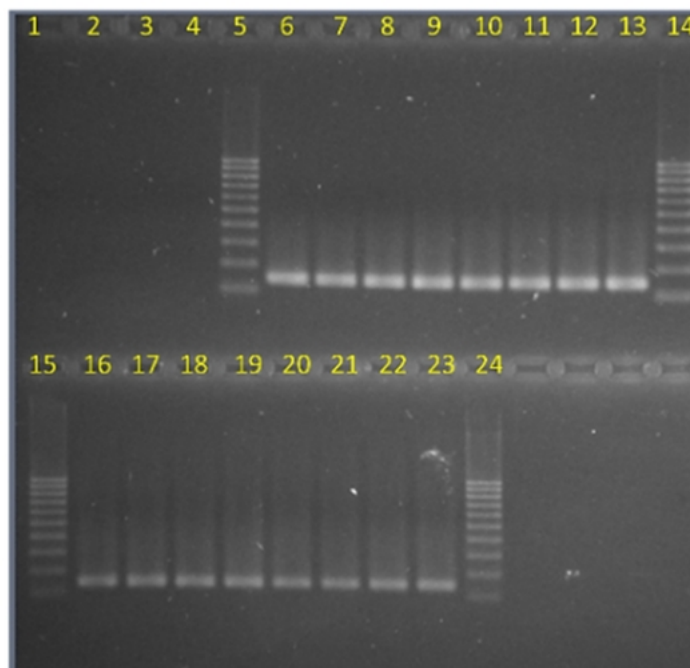
1. Padrão de peso molecular (100pb)
2. *M. orale* 50cp em 20µL de reação
3. *M. orale* 50cp em 20µL de reação
4. *M. orale* 50cp em 20µL de reação com Balb 3T3 clone A31
5. *M. orale* 50cp em 20µL de reação com Balb 3T3 clone A31
6. *M. orale* 50cp em 20µL de reação com MCF-7
7. *M. orale* 50cp em 20µL de reação com MCF-7
8. Padrão de peso molecular (100pb)
9. *M. arg* 50cp em 20µL de reação
10. *M. arg* 50cp em 20µL de reação
11. *M. arg* 50cp em 20µL de reação com Balb 3T3 clone A31
12. *M. arg* 50cp em 20µL de reação com Balb 3T3 clone A31
13. *M. arg* 50cp em 20µL de reação com MCF-7
14. *M. arg* 50cp em 20µL de reação com MCF-7
15. Padrão de peso molecular (100pb)
16. Padrão de peso molecular (100pb)
17. *A. laid* 50cp em 20µL de reação
18. *A. laid* 50cp em 20µL de reação
19. *A. laid* 50cp em 20µL de reação com Balb 3T3 clone A31
20. *A. laid* 50cp em 20µL de reação com Balb 3T3 clone A31
21. *A. laid* 50cp em 20µL de reação com MCF-7
22. *A. laid* 50cp em 20µL de reação com MCF-7
23. Padrão de peso molecular (100pb)
24. NTC Multiplex myc_spp_deg e A.laid3



Fonte: Produzido pelo autor

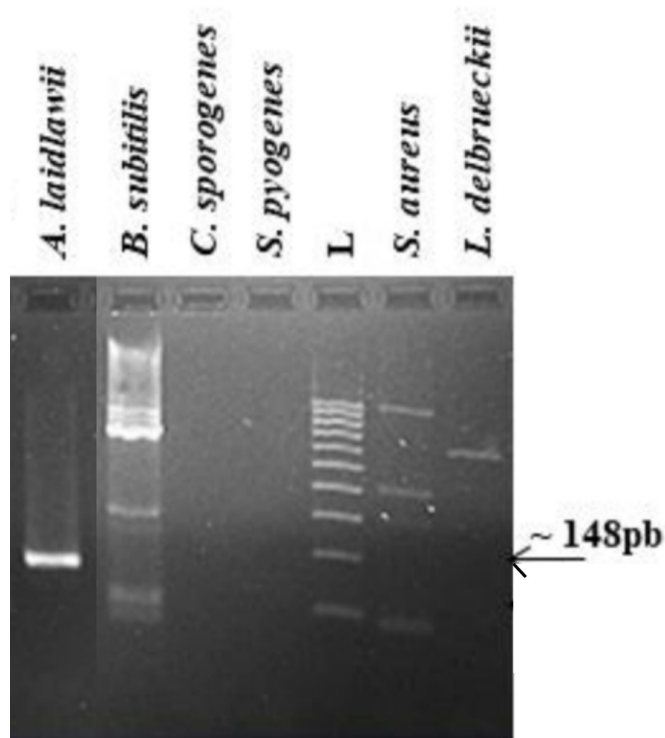
Figura 18 – Produtos da PCR desenvolvida com iniciadores A.laid3 F e R (Singleplex) de *A. laidlawii* com diferentes matrizes, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%

1. NTC singleplex A.laid3
2. NTC singleplex A.laid3 com matriz MDCK-2
3. NTC singleplex A.laid3 com matriz MCF-7
4. NTC singleplex A.laid3 com matriz IEC-6
5. Padrão de peso molecular (100pb)
6. *A. laid* 1000cp em 20µL de reação
7. *A. laid* 1000cp em 20µL de reação
8. *A. laid* 1000cp em 20µL de reação com MDCK-2
9. *A. laid* 1000cp em 20µL de reação com MDCK-2
10. *A. laid* 1000cp em 20µL de reação com MCF-7
11. *A. laid* 1000cp em 20µL de reação com MCF-7
12. *A. laid* 1000cp em 20µL de reação com IEC-6
13. *A. laid* 1000cp em 20µL de reação com IEC-6
14. Padrão de peso molecular (100pb)
15. Padrão de peso molecular (100pb)
16. *A. laid* 10cp em 20µL de reação
17. *A. laid* 10cp em 20µL de reação
18. *A. laid* 10cp em 20µL de reação com MDCK-2
19. *A. laid* 10cp em 20µL de reação com MDCK-2
20. *A. laid* 10cp em 20µL de reação com MCF-7
21. *A. laid* 10cp em 20µL de reação com MCF-7
22. *A. laid* 10cp em 20µL de reação com IEC-6
23. *A. laid* 10cp em 20µL de reação com IEC-6
24. Padrão de peso molecular (100pb)



Fonte: Produzido pelo autor

Figura 19 – Seletividade da PCR com *A. laidlawii* e Bactérias Filogeneticamente Próximas



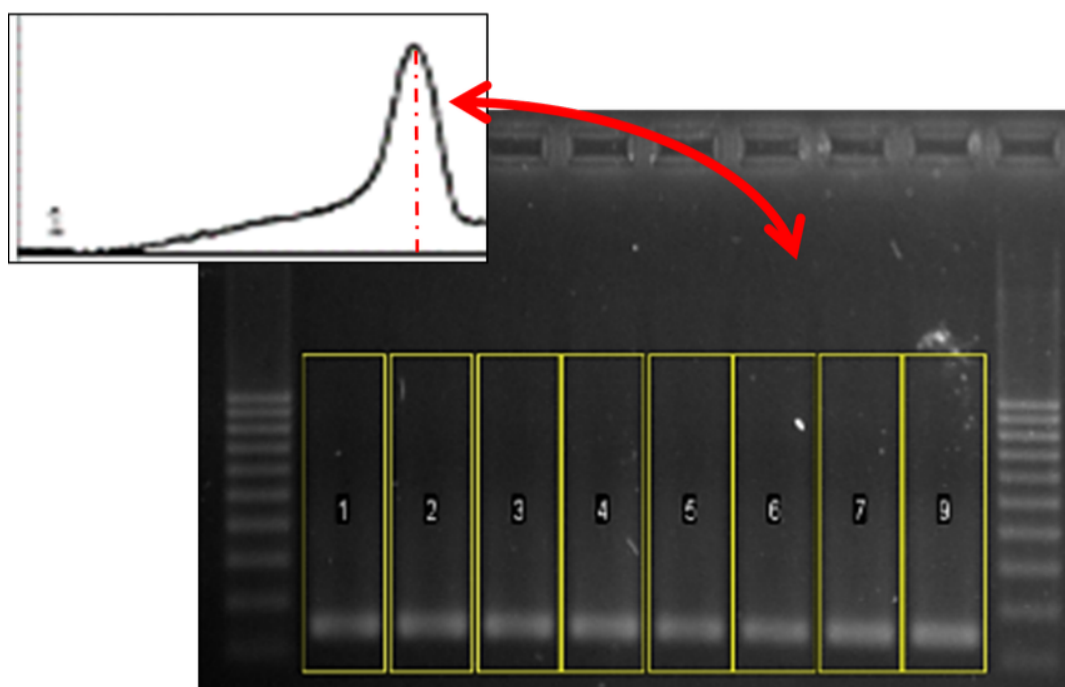
Fonte: Adaptado de RAMOS-JUNIOR (2018)

5.5.2 Densitometria Óptica:

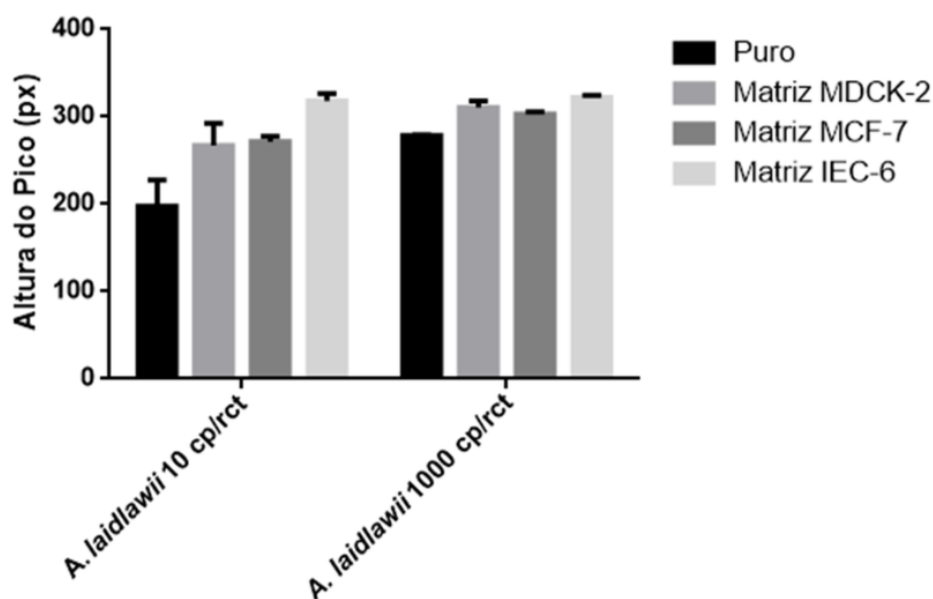
A densitometria óptica solucionou a questão pertinente as matrizes celulares, se as mesmas eram capazes de inibir a amplificação ou gerar interferência na intensidade das bandas no gel de agarose (produtos da eletroforese) quando adicionados conteúdo dessas matrizes na reação de PCR.

O experimento utilizado como base para a densitometria óptica foi a seletividade de *A.laid* em Singleplex, na Figura 18, justamente por ter sido realizado com duplicatas de diferentes concentrações de DNA e matrizes diversas (MDCK-2, IEC-6 e MCF-7 com seus respectivos meios de cultura e componentes de cultura celular). A densitometria foi executada por um *software* chamado ImageJ, onde a intensidade da fluorescência de cada banda no gel foi transformada em gráficos (Figura 20), no qual a altura do pico em pixels (px) mostrou que todas as matrizes testadas influenciaram positivamente na detecção do *A.laidlawii* (intensificaram a fluorescência da banda). No entanto, a matriz MCF-7 foi a que menos influenciou (Figura 21). Por este motivo, o limite de detecção foi realizado com esta matriz.

Figura 20 – Exemplo de Gráfico Gerado pelo ImageJ



Fonte: Produzido pelo autor

Figura 21 – Densitometria Óptica da Seletividade com *A. laidlawii*

Fonte: Produzido pelo autor

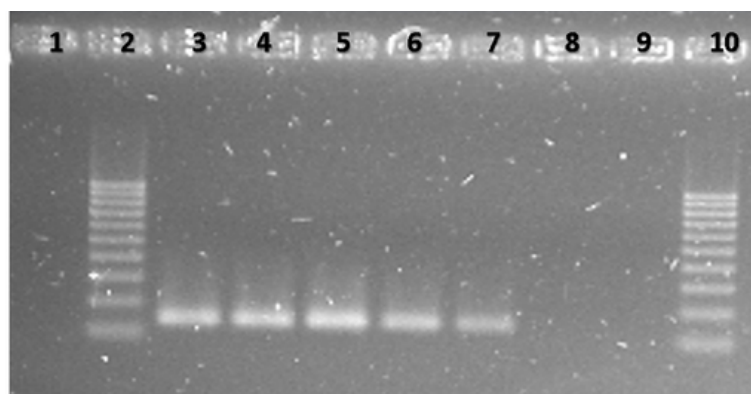
5.5.3 Limite de Detecção (LOD):

5.5.3.1 Limite de detecção preliminar:

Para o limite de detecção preliminar de *A. laidlawii*, foi utilizada a curva de diluição quantificada por ddPCR (Figura 15), e para o *M. orale*, as novas diluições (Tabela 9) baseadas na última quantificação (Figura 16). Das concentrações desejadas foi retirado 3 μ L e adicionado ao conteúdo da PCR para posterior análise em gel de agarose 3% TAE. Todas as amostras foram avaliadas com a matriz MCF-7. A última amostra a apresentar banda no gel de agarose foi a de concentração de 5 cópias de DNA em 20 μ L de reação (Figura 22) para *A. laidlawii* e 100 cópias de DNA em 20 μ L de reação para *M. orale* (Figura 23).

Figura 22 – Limite de Detecção Preliminar da PCR desenvolvida com iniciadores A.laid3 F e R (Singleplex) de *A. laidlawii* com matriz MCF-7, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%

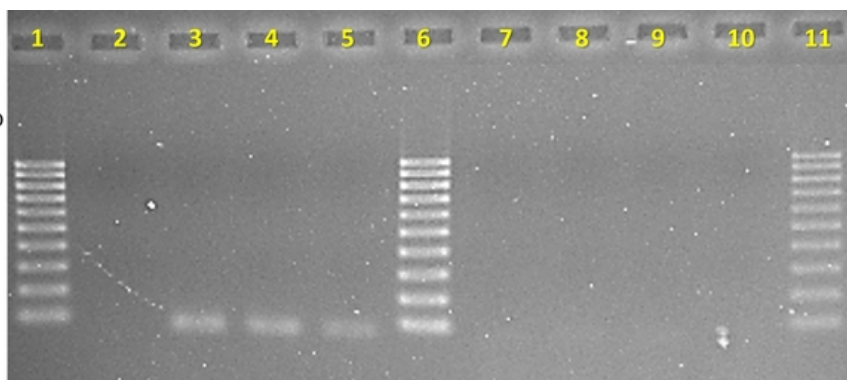
1. NTC A.laid3 F e R com MCF-7
2. Padrão de peso molecular (100pb)
3. *A. laid* 10.000cp em 20µL de reação com MCF-7
4. *A. laid* 1.000cp em 20µL de reação com MCF-7
5. *A. laid* 100cp em 20µL de reação com MCF-7
6. *A. laid* 10cp em 20µL de reação com MCF-7
7. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
8. *A. laid* 1cp em 20µL de reação com MCF-7
9. *A. laid* 0,1cp em 20µL de reação com MCF-7
10. Padrão de peso molecular (100pb)



Fonte: Produzido pelo autor

Figura 23 – Limite de Detecção Preliminar da PCR desenvolvida com iniciadores Myc_spp_deg F e R (Singleplex) de *M. orale*, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%

1. Padrão de peso molecular (100pb)
2. NTC Myc_spp_deg F e R
3. *M. orale* 10.000cp em 20µL de reação
4. *M. orale* 1.000cp em 20µL de reação
5. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
6. Padrão de peso molecular (100pb)
7. *M. orale* 10cp em 20µL de reação
8. *M. orale* 5cp em 20µL de reação
9. *M. orale* 1cp em 20µL de reação
10. *M. orale* 0,1cp em 20µL de reação
11. Padrão de peso molecular (100pb)



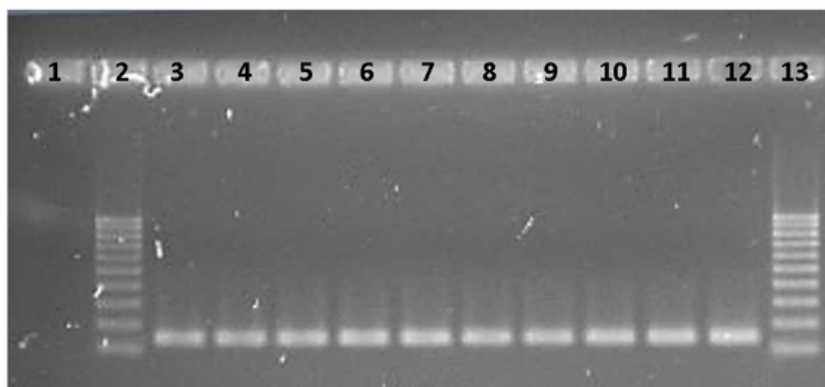
Fonte: Produzido pelo autor

5.5.3.2 Limite de detecção definitivo:

No limite de detecção definitivo, foram testadas 10 amostras em replicata com 5 cópias de DNA em 20µL de reação para *A. laidlawii* e 100 cópias de DNA em 20µL de reação para *M. orale*, em que todas apresentaram banda. Assim foi determinado o limite de detecção com intervalo de confiança de 100% (Figura 24 e 25).

Figura 24 – Limite de Detecção Definitivo da PCR desenvolvida com iniciadores A.laid3 F e R (Singleplex) de *A. laidlawii* com matriz MCF-7, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%

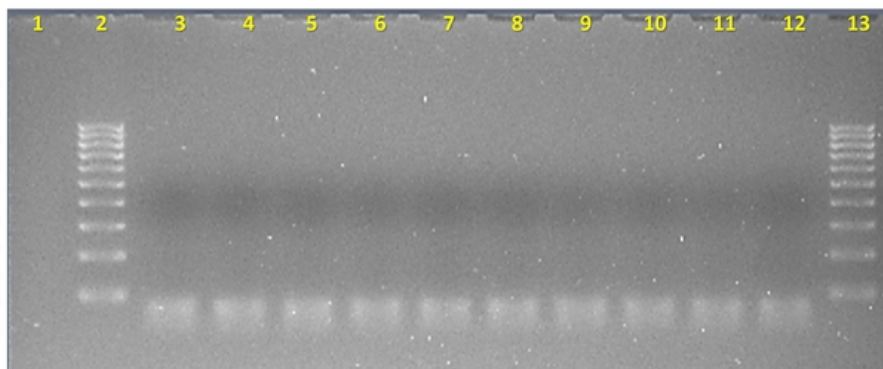
1. NTC A.laid3 F e R com MCF-7
2. Padrão de peso molecular (100pb)
3. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
4. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
5. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
6. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
7. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
8. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
9. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
10. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
11. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
12. *A. laid* 5cp em 20µL de reação com MCF-7
13. Padrão de peso molecular (100pb)



Fonte: Produzido pelo autor

Figura 25 – Limite de Detecção Definitivo da PCR desenvolvida com iniciadores Myc_spp_deg F e R (Singleplex) de *M. orale*, visualizados por Eletroforese em gel de agarose 3%

1. NTC Myc_spp_deg F e R
2. Padrão de peso molecular (100pb)
3. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
4. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
5. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
6. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
7. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
8. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
9. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
10. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
11. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
12. *M. orale* 100cp em 20µL de reação
13. Padrão de peso molecular (100pb)



Fonte: Produzido pelo autor

6 DISCUSSÃO:

Mycoplasmas e *Acholeplasmas* podem ultrapassar os filtros de esterilização utilizados em culturas celulares, assim podendo facilmente contaminá-las, gerando efeitos citopáticos e conseqüentemente, resultados incertos que descredibilizam produtos de laboratórios e indústrias biotecnológicas (HARASAWA, 1993). Por essa razão a urgência de se desenvolver um método rápido, sensível e barato para estas rotinas de detecção.

Ainda que metodologias mais tradicionais, usadas para a detecção de micoplasmas sejam consideradas técnicas “padrão ouro”, como o Método ágar e caldo para cultivo de *Mycoplasmas*, não estão isentas de limitações. Os métodos alternativos surgiram para superar algumas barreiras. No entanto, esses ensaios mais recentes têm suas próprias desvantagens. Isso inclui os desafios envolvidos na validação dos ensaios alternativos e na demonstração de que eles são comparáveis, em termos de eficiência, aos ensaios convencionais.

Como evidenciado nos resultados deste projeto, foi possível a análise dos DNA de *Mycoplasmas* e *Acholeplasma* por ddPCR com iniciadores myc_spp_deg (F e R) e A.laid3 (F e R), e utilizar dos resultados obtidos para o desenvolvimento dos padrões que permitiram determinar a concentração de ácidos nucleicos nas amostras utilizadas nos ensaios de validação da PCR, logo, podemos identificar um diferencial aos demais testes que utilizam culturas celulares, já que asseguramos um resultado de concentração do alvo em cópias por volume de reação (20µL), ou cópias por microlitro, onde usualmente vemos, nos demais testes em UFC/mL.

No teste de seletividade, observamos que houve amplificação de bactérias filogeneticamente próximas, com os iniciadores myc_spp_deg e A.laid3, que apesar de ser correspondente a regiões conservadas de RNA transportadores, é semelhante ao resultado de seletividade apresentado por Deutschmann, Kavermann e Knack (2010) que utiliza a região 16S rRNA, onde relata que devido à estreita relação filogenética entre esses microrganismos, foi constatada alguma reatividade cruzada com as bactérias Gram-positivas em um nível alto: 10^3 UFC/mL ou acima. Da mesma forma, é possível diferenciar as espécies de *Mycoplasmas* destas outras bactérias pelo tamanho do fragmento gerado em PCR, quando vistas no gel de agarose. No entanto, Tabatabaei-Qomi, Sheykh-Hasan, Fazaely, Kalhor e Ghiasi (2014) afirma não ter amplificações de outras bactérias, além de *Mycoplasmas*, em sua PCR, mesmo testando diversas amostras de DNA, como: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*.

Por fim, temos como diferencial de seletividade a análise da densitometria óptica, até então, ensaio não encontrado em outros estudos com o propósito de detecção de micoplasmas. Por meio desta análise, sabemos que as matrizes interferem positivamente na intensidade da banda de A. laid no gel de agarose.

Sobre o limite de detecção, Tabatabaei-Qomi, Sheykh-Hasan, Fazaely, Kalhor e Ghiasi (2014) estabeleceram 10 UFC/mL como apropriado para o seu método; Deutschmann, Kavermann e Knack (2010) também conseguiram estabelecer uma definição, em que todas as amostras testadas puderam ser detectadas entre 10 e 0,1 UFC/mL. Especificamente, *Acholeplasma laidlawii* 4,72 UFC/mL e *Mycoplasma orale* 0,11 UFC/mL, em comparação ao limite de detecção aqui definido, detectamos *Acholeplasma laidlawii* em até 5 cópias em 20 μ L de reação e *Mycoplasma orale* em até 100 cópias em 20 μ L de reação.

Apesar de possuir pouco material disponível na literatura, para comparação e debate desta nova metodologia, podemos concordar que o método se encontra validado para a detecção de *Mycoplasma orale* e *Acholeplasma laidlawii* em cultura de células.

Para concluirmos a validação com os outros *Mycoplasmas*, precisaremos de mais tempo para otimizar o iniciador Myc_spp_deg, ou até mesmo desenvolver outro *in house*, descobrir o que está resultando nas bandas inespecíficas e no excesso de “chuva” (micelas entre as populações positivas e negativas) na quantificação do ddPCR. A definição e inserção de um controle de amplificação só poderá acontecer quando tivermos a eficiência do iniciador totalmente estabelecida.

REFERÊNCIAS

- BAKER, M. 1.500 scientists lift the lid on reproducibility. **Nature**, v. 533, p. 452 – 454, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/533452a>. Citado na página 19.
- BASU, A. S. Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR. **SLAS technology**, v. 22, n. 4, p. 369 – 386, 8 2017. Citado na página 48.
- BULGARI, D.; CASATI, P.; BRUSETTI, L.; QUAGLINO, F.; BRASCA, M.; DAFFONCHIO, D.; BIANCO, P. A. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. **The Journal of Microbiology**, v. 47, p. 393 – 401, Set 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12275-009-0082-1>. Citado na página 30.
- CITTI, C.; BLANCHARD, A. Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 4, p. 196 – 203, 4 2013. Citado na página 20.
- DALMIRA, F.; MELINA, P.; JOSÉ-BENIGNO, V. T.; JOSEFINA, L.; RAYMUNDO, G.; ABRAHAM, A. Development, Optimization, and Evaluation of a Duplex Droplet Digital PCR Assay To Quantify the T-nos/hmg Copy Number Ratio in Genetically Modified Maize. **Anal. Chem.**, v. 88, n. 1, p. 812 – 819, 1 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03238>. Citado na página 24.
- DEPREZ, L.; CORBISIER, P.; KORTEKAAS, A.; MAZOUA, S.; HIDALGO, R. B.; TRAPMANN, S.; EMONS, H. Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentrations by using a certified reference material. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 9, p. 29 – 39, 9 2016. Citado na página 24.
- DEUTSCHMANN, S. M.; KAVERMANN, H.; KNACK, Y. Validation of a NAT-based Mycoplasma assay according European Pharmacopoeia. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 238 – 248, 3 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1045105609001766>. Citado 2 vezes nas páginas 64 e 65.
- DOQ-CGCRE-008. **ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS**. [S.I.], 2020. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 34.
- DREXLER, H. G.; UPHOFF, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. **Cytotechnology**, Kluwer Academic Publishers, v. 39, n. 2, p. 75 – 90, 2002. ISSN 0920-9069. Citado na página 23.
- DUEWER, D. L.; KLINE, M. C.; ROMSOS, E. L.; TOMAN, B. Evaluating droplet digital PCR for the quantification of human genomic DNA: converting copies per nanoliter to nanograms nuclear DNA per microliter. **Anal Bioanal Chem**, v. 410, n. 12, p. 2879 – 2887, 5 2018. Citado na página 24.
- FREEDMAN, L. P.; GIBSON, M. C.; ETHIER, S. P.; SOULE, H. R.; NEVE, R. M.; REID, Y. A. Reproducibility : changing the policies and culture of cell line authentication. **Nat Methods**, v. 12, n. 6, p. 493 – 497, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3403>. Citado na página 19.
- FRESHNEY, R. I. (ed.). **Culture of animal cells**: a manual of basic technique and specialized applications. 7. ed. [S.I.]: John Wiley & Sons, 2015. 736 p. Citado na página 19.

FREY, M. L.; HANSON, R. P.; ANDRSON, D. P. A medium for the isolation of avian mycoplasmas. v. 29, n. 11, p. 2163 – 71, 11 1968. Citado na página 27.

HARASAWA, R.; MIZUSAWA, H.; NOZAWA, K.; NAKAGAWA, T.; ASADA, K.; KATO, I. Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. **Research in Microbiology**, v. 144, n. 6, p. 489 – 493, 7 1993. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0923250893900579>. Citado na página 64.

HINDSON, B. J.; NESS, K. D.; MASQUELIER, D. A.; BELGRADER, P.; HEREDIA, N. J.; MAKAREWICZ, A. J.; BRIGHT, I. J.; LUCERO, M. Y.; HIDDESEN, A. L.; LEGLER, T. C.; KITANO, T. K.; HODEL, M. R.; PETERSEN, J. F.; WYATT, P. W.; STEENBLOCK, E. R.; SHAH, P. H.; BOUSSE, L. J.; TROUP, C. B.; MELLEN, J. C.; WITTMANN, D. K.; ERNDT, N. G.; CAULEY, T. H.; KOEHLER, R. T.; SO, A. P.; DUBE, S.; ROSE, K. A.; MONTESCLAROS, L.; WANG, S.; STUMBO, D. P.; HODGES, S. P.; ROMINE, S.; MILANOVICH, F. P.; WHITE, H. E.; REGAN, J. F.; KARLIN-NEUMANN, G. A.; HINDSON, C. M.; SAXONOV, S.; COLSTON, B. W. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. v. 83, n. 22, p. 8604 – 8610, 11 2011. Citado na página 24.

HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1863 – 1868, 5 2004. Citado na página 23.

ISO/IEC17025. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**, International Organization for Standardization, 2017. Citado na página 23.

JEAN, A.; TARDY, F.; ALLATIF, O.; GROSJEAN, I.; BLANQUIER, B.; GERLIER, D. Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172358 –, 2 2017. Citado na página 21.

KOŠIR, A. B.; DIVIETO, C.; PAVŠIČ, J.; PAVARELLI, S.; DOBNIK, D.; DREO, T.; BELLOTTI, R.; SASSI, M. P.; ŽEL, J. Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR. v. 409, n. 28, p. 6689 – 6697, 11 2017. Citado na página 24.

NETTO, C.; SOCCOL, V. T.; SEPULVEDA, L. M.; TIMENETSKY, J. Experimental infection of BHK21 and Vero cell lines with different Mycoplasma spp. **Braz. J. Microbiol**, v. 45, n. 4, p. 1513 – 1519, 12 2014. Citado na página 21.

NIKFARJAM, L.; FARZANEH, P. Prevention and detection of mycoplasma contamination in cell culture. **Cell J**, v. 13, n. 4, p. 203 – 212, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 21.

OECD. **ENVIRONMENT DIRECTORATE JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY**. [S.l.], 2018. Citado na página 23.

OLARERIN-GEORGE, A. O.; HOGENESCH, J. B. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. **Nucleic Acids Research**, Oxford University Press, v. 43, n. 5, p. 2535 – 2542, 3 2015. ISSN 0305-1048. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv136>. Citado na página 20.

- OLIVEIRA, T. F. P. de; FONSECA, A. A.; CAMARGOS, M. F.; OLIVEIRA, A. M. de; COTTORELLO, A. C. P.; SOUZA, A. dos R.; ALMEIDA, I. G. de; HEINEMANN, M. B. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. **Biologicals**, v. 41, n. 6, p. 407 – 414, 11 2013. Citado na página 21.
- PRUESSE, E.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. **Bioinformatics**, v. 28, n. 14, p. 1823 – 1829, 7 2012. Citado na página 31.
- RAMOS JUNIOR, J. L. P. Desenvolvimento, otimização e avaliação de uma nova reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) e digital em micelas (ddPCR) para detecção de baixo custo e quantificação de micoplasmas em cultivos celulares. 2018. Citado 4 vezes nas páginas 23, 32, 34 e 58.
- REVELL, L. J. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). **Methods in ecology and evolution**, v. 3, n. 2, p. 217 – 223, 4 2012. Citado na página 32.
- ROBINSON, L. B.; WICHELHAUSEN, R. H.; ROIZMAN, B. Contamination of Human Cell Cultures by Pleuropneumonia-like Organisms. **SCIENCE**, v. 124, n. 3232, p. 1147 – 1148, 12 1956. Citado na página 19.
- ROTTEM, S. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. **Physiological reviews**, v. 83, n. 2, p. 417 – 432, 4 2003. Citado na página 21.
- SANGER, F.; COULSON, A. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. v. 94, n. 3, p. 441 – 448, 5 1975. Citado na página 30.
- SHMUEL, R.; DAVID, Y.; YEHUDITH, N. Molecular biology and pathogenicity of phytoplasmas. **Annals of applied Biology**, v. 62, n. 2, p. 1094 – 1156, 1998. Citado na página 19.
- 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. **Iran J Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 281 – 4, 8 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802713><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4367946>. Citado 2 vezes nas páginas 64 e 65.
- TANG, J.; HU, M.; LEE, S.; ROBLIN, R. A polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, n. 2, p. 121 – 126, 2000. Citado na página 20.
- TRULLOLS, E.; RUISÁNCHEZ, I.; RIUS, F. Validation of qualitative analytical methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 137 – 145, 2 2004. Citado na página 22.
- VOLOKHOV, D. V.; GRAHAM, L. J.; BRORSON, K. A.; CHIZHIKOV, V. E. Mycoplasma testing of cell substrates and biologics : Review of alternative non-microbiological techniques q. **Molecular and Cellular Probes**, v. 25, n. 2-3, p. 69 – 77, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2011.01.002>. Citado na página 19.
- WRIGHT, E. S.; BAUM, D. A. Exclusivity offers a sound yet practical species criterion for bacteria despite abundant gene flow. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 724 –, 12 2018. Citado na página 30.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLÖCKNER, F. O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.; WHITMAN, W. B.; EUZÉBY, J.; AMANN, R.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 9, p. 635 – 645, 9 2014. Citado na página 30.

YOON, S.; HA, S.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 67, n. 5, p. 1613 – 1617, 5 2017. Citado na página 31.

YOUNG, L.; SUNG, J.; STACEY, G.; MASTERS, J. R. Detection of Mycoplasma in cell cultures. v. 5, n. 5, p. 929 – 934, 5 2010. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 22.

YU, G.; SMITH, D. K.; ZHU, H.; GUAN, Y.; LAM, T. T. GGTREE: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 1, p. 28 – 36, 1 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>. Citado na página 32.

YU, T.; WANG, Y.; ZHANG, H.; JOHNSON, C. H.; JIANG, Y.; LI, X.; WU, Z.; LIU, T.; KRAUSZ, K. W.; YU, A.; GONZALEZ, F. J.; HUANG, M.; BI, H. Metabolomics reveals mycoplasma contamination interferes with the metabolism of PANC-1 cells. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 16, p. 4267 – 4273, 6 2016. Citado na página 21.

ZHI, Y.; MAYHEW, A.; SENG, N.; TAKLE, G. B. Validation of a PCR method for the detection of mycoplasmas according to European Pharmacopoeia section 2.6.7. **Biologicals**, v. 38, n. 2, p. 232 – 237, 3 2010. Citado na página 21.