

APLICAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DETECÇÃO DE *Mycoplasma* spp NA ROTINA DE CULTIVOS CELULARES

MARCELO FERNANDES CAMARGOS,¹ ANAPOLINO MACEDO DE OLIVEIRA,¹ ANTÔNIO AUGUSTO FONSECA JÚNIOR,¹ ANSELMO VASCONCELOS RIVETTI,² PEDRO MOREIRA COUTO MÓTTA,² RONNIE ANTUNES DE ASSIS³ E RÔMULO CERQUEIRA LEITE⁴

1. Fiscais federais agropecuários do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV) do LANAGRO/MG

2. Fiscais agropecuários do IMA lotados no LDDV do LANAGRO/MG

3. Especialista em Sistemas Laboratoriais B do Laboratório de Clostridioses do LANAGRO, MG

4. Professor da disciplina de Doenças a Vírus da Escola de Veterinária da UFMG

RESUMO

A ocorrência de *Mycoplasma* spp como contaminante de cultivos celulares nos laboratórios de cultivo celular da Escola de Veterinária da UFMG e do Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais foi estabelecida através da implementação de um protocolo rápido de extração de DNA e pela utilização da PCR. Avaliaram-se a sensibilidade e especificidade da PCR. Realizou-se pesqui-

sa de DNA de *Mycoplasmas* em 83 amostras de linhagens celulares e encontraram-se linhagens infectadas nos dois laboratórios avaliados. A qualidade do DNA extraído foi verificada utilizando-se a PCR para o gene da beta-actina. A pesquisa de *Mycoplasmas* por PCR mostrou-se rápida, sensível e específica.

PALAVRAS-CHAVES: Beta-actina, celular, cultivo, *Mycoplasma* spp, PCR.

ABSTRACT

APPLICATION OF POLIMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF *Mycoplasma* spp IN THE ROUTINE OF CELL CULTURES

The occurrence of *Mycoplasma* spp as contaminant of cell cultures in cell culture laboratories of the Escola de Veterinária da UFMG and of the Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais was obtained by the use of a fast DNA extraction protocol and by the use of PCR. The PCR sensitivity and specificity were evaluated. The search

for *Mycoplasmas* DNA was done in 83 cell lines samples. We found infected cell lines in both laboratories. The quality of extracted DNA was verified using a beta-actin gene PCR. The *Mycoplasmas*'s PCR showed to be fast, sensitive and specific.

KEY WORDS: Beta-actin, cell, culture, *Mycoplasma* spp, PCR.

INTRODUÇÃO

O termo cultivo celular é utilizado para determinar o conjunto de técnicas que permite a manipulação e a manutenção de células *in*

vitro, preservando ao máximo suas características fisiológicas, bioquímicas e genéticas. A utilização dessa técnica possui grande aplicabilidade na virologia, através do seu uso em métodos de diagnóstico, produção de proteínas

recombinantes, manutenção de cepas virais etc.

Cultivos celulares podem ser contaminados por diversas espécies do gênero *Mycoplasma*. A contaminação ocorre diretamente através da manipulação pelo pessoal técnico ou pela formação de aerossóis durante o processo de tripsinização em repiques celulares (CHENG et al., 2007) ou indiretamente por reagentes utilizados nos meios de manutenção como o soro fetal bovino. As espécies comumente transmitidas por meio de reagentes dos meios de cultivo celular são *Mycoplasma arginini* e *Mycoplasma hyorhinis*; já as contaminações oriundas dos manipuladores são normalmente associados com *Mycoplasma orale* e *Mycoplasma fermentans*. As contaminações que ocorrem através de permutas de linhagens celulares entre laboratórios são frequentemente relacionadas com *M. hyorhinis* (STACEY & DOYLE, 1997; KONG et al., 2001).

Contaminações por *Mycoplasma* spp podem causar alterações nas células infectadas, como mudanças nas características da replicação e crescimento celular, na composição e estrutura da membrana plasmática (McGARRITY & KOTANI, 1985). Elas implicam a inutilização de uma linhagem celular infectada, pois tais mudanças podem interferir com as características morfológicas e fisiológicas das células, assim como impedir ou dificultar o ciclo de infecção e/ou replicação de um determinado vírus nesses cultivos infectados. Além disso, tais contaminações podem tornar experimentos e produtos biológicos inviáveis (KONG et al., 2001).

A técnica de cultivo celular é uma ferramenta fundamental nas técnicas virológicas. Por essa razão, tornam-se, assim, indispensáveis a manipulação adequada de tais cultivos, o controle de soros, tripsina e componentes dos meios utilizados, além da avaliação periódica de linhagens celulares no que se refere à presença de *Mycoplasma* spp.

A detecção de espécies de *Mycoplasma* como contaminante de cultivos celulares pode ser realizada por métodos como o isolamento em meio de cultura em anaerobiose e classificação por testes bioquímicos, utilização de corantes

fluorescentes de DNA para inferência de uma possível contaminação. Ainda também por técnicas imunológicas e moleculares (GARNER et al., 2000).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) – em cultivos celulares para a detecção grupo-específico do gênero *Mycoplasma*, a partir da amplificação de um fragmento pertencente a uma região extremamente conservada entre todas as espécies desse gênero – foi descrita por van KUPPEVELD et al. (1994) como mais eficiente que o isolamento em meios de cultura. Isso porque este teste é mais demorado e menos sensível do que a PCR. Outros métodos de PCR são utilizados, como a técnica de Nested-PCR, para identificação das espécies (KONG et al., 2007), o uso de PCR/microarranjo (SUNG et al., 2006) e testes bioquímicos, como o MycoAlert (MARIOTTI et al., 2008). Tais testes, apesar de serem sensíveis e eficientes, possuem como inconvenientes o risco de contaminação, o preço, além da dependência do uso de *kits*, respectivamente.

O objetivo deste trabalho foi descrever uma metodologia simplificada de diagnóstico por PCR, para uso na rotina de detecção para *Mycoplasma* spp, de maneira rápida e eficaz em linhagens celulares. A finalidade é monitorar ou eliminar a presença desse contaminante em cultivos celulares.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente empregaram-se sete amostras de linhagens celulares com resultados já conhecidos de infecção por *Mycoplasma* spp. Essas amostras foram avaliadas pelo método de coloração de DNA com Bisbenzamide Fluorochrome (OLSON & BARILE, 1988), antes da avaliação pela técnica da PCR. Na PCR, testaram-se 83 partidas de congelamento correspondentes a 29 linhagens celulares diferentes, provenientes dos Laboratórios de Virologia Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG) e do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO, MG) pertencente à rede de Laboratórios Oficiais do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Tabela 1).

TABELA 1. Linhagens/partidas células testadas para *Mycoplasma* spp

Linhagens celulares testadas	N° de partidas testadas		N° de partidas infectadas <i>Mycoplasma</i> spp	
	EV-UFMG	LANA-GRO MG	EV-UFMG	LANA-GRO MG
BHK ₂₁	3	9		2
BT	-	4	-	3
CrFK	-	2	-	-
C6/36	1	-	-	-
CC81	1	-	-	-
CHO-K1	1	-	-	-
ED	2	3	-	-
EPC	1	-	-	-
FEG	1	-	-	-
FLK	2	-	1	-
HCT-8	1	-	-	-
HELA	1	-	-	-
IBRS2	1	-	1	-
INT-407	1	-	-	-
KATO III	1	-	-	-
L929	1	-	-	-
MA-104	1	2	1	-
MB	1	-	1	-
MDBK	5	6	2	2
MDCK	1	-	-	-
MSC	1	-	-	-
N ₂ A	-	1	-	1
PK15	2	9	-	-
P ₃ X	1	-	-	-
RK ₁₃	1	3	-	-
SK6	2	4	-	-
ST	1	-	1	-
VERO	1	4	-	-
Y ₁	1	-	1	-
Total de partidas infectadas	36	47	8	8

A PCR, descrita por van KUPPEVELD et al. (1994), foi utilizada neste estudo com algumas modificações. Para a extração do DNA, empregou-se proteinase K na concentração final de 60 µg/mL e incubada durante sessenta

minutos a 60°C e posteriormente por dez minutos a 95°C. Cada linhagem/partida celular testada era oriunda de ampolas criopreservadas com a concentração de 2-5 x 10⁶ células/mL. Com o objetivo de diminuir o custo por reação com os insumos, sem que ocorresse perda da eficácia da PCR, procedeu-se a um teste de sensibilidade, para comparar a eficiência da reação com um volume total de 50 µL e 20 µL pela utilização de diluições seriadas do DNA do controle positivo (*Mycoplasma bovis genitalium*, Instituto Biológico, SP). A avaliação da sensibilidade analítica foi feita a partir das diluições citadas. Obteve-se a concentração do DNA por espectrofotometria. Confirmou-se a especificidade do produto amplificado por seqüenciamento no seqüenciador ABI 3130 da Applied Biosystems.

As linhagens/partidas testadas foram submetidas à técnica de PCR, para o gene normalizador da β-actina (MONIWA et al., 2005), utilizado como controle da eficiência do método de extração de DNA – por ser um gene constitutivo e estar presente em todas as células de animais –, e para avaliação a presença de possíveis inibidores da PCR.

Os produtos das PCRs foram resolvidos em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE e corados por brometo de etídeo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na comparação entre o método de coloração de DNA e a técnica da PCR, nas sete amostras avaliadas, observou-se uma total concordância entre esses dois métodos. Entretanto, a técnica da PCR é específica e rápida.

A sensibilidade da PCR mostrou-se igual, para os dois volumes de reação utilizados. Foi possível detectar o DNA do controle positivo até na diluição 1:300, o que correspondeu a um valor de sensibilidade analítica de 0,33 ng de DNA.

A PCR para *Mycoplasma* spp apresentou resultados positivos em dezesseis partidas de células (de oito linhagens diferentes) (Tabela 1), amplificando fragmentos de 280 pares de base (pb) (Figura 1). Os resultados deste estudo corroboram os de TIMENETSKY et al. (2006),

que utilizaram os mesmos iniciadores, mas com método de extração, volume e concentrações diferentes para a reação da PCR. Ao avaliarem a presença de *Mycoplasmae* em cultivos celulares de quinze laboratórios situados no estado de São Paulo, os autores citados encontraram doze laboratórios com cultivos celulares infectados.

Na PCR para β -actina, observou-se em todas as linhagens um produto amplificado correspondente a um fragmento de 130 pb, como descrito por MONIWA et al. (2005). Entretanto, nas linhagens das células BHK-21 (*baby hamster kidney*) e CHO-K1 (*chinese hamster ovary*), além do fragmento de 130 pb observado em todas as linhagens, registrou-se um fragmento com aproximadamente 350 pb (Figura 2).

O fragmento de aproximadamente 350 pb foi seqüenciado e a seqüência de nucleotídeos foi submetida ao *GenBank*, recebendo o número de acesso EU044764. Comparando esta seqüência com as seqüências disponíveis através do *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (GERTZ

et al., 2006), houve uma elevada identidade com seqüências do gene da β -actina.

Os produtos da PCR do controle positivo (*M. bovis genitalium*) e de uma linhagem celular FLK infectada (*fetal lamb kidney*) foram seqüenciados e as seqüências de nucleotídeos depositadas no *GenBank* recebendo, respectivamente, os seguintes números de acesso EU044762 e EU044763. Essas seqüências foram submetidas à busca no BLAST e apresentaram homologia, respectivamente, com seqüências de *Mycoplasma bovis genitalium* e *Mycoplasma hyorhinis*.

A observação de que três amostras diagnosticadas como positivas para *Mycoplasma* spp eram originadas de um mesmo laboratório reforça a necessidade da avaliação de qualquer linhagem celular introduzida na rotina de um laboratório de cultivo celular. Somam-se a este cuidado a avaliação de todos os reagentes empregados em cultivos celulares, assim como o treinamento adequado de manipuladores e técnicos envolvidos.

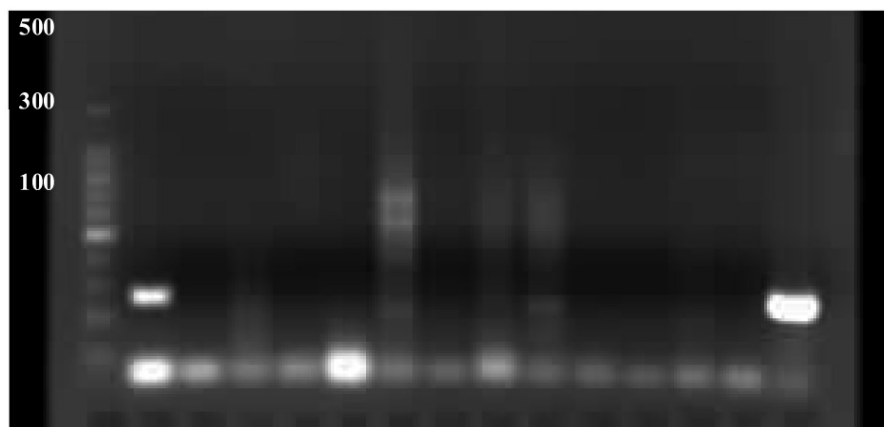


FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. PCR para *Mycoplasma* spp. TM= padrão de tamanho molecular 100 pb; C+= controle positivo; C-= controle negativo; canaletas 1-11= amostras negativas; canaleta 12= amostra positiva (Linhagem celular FLK).

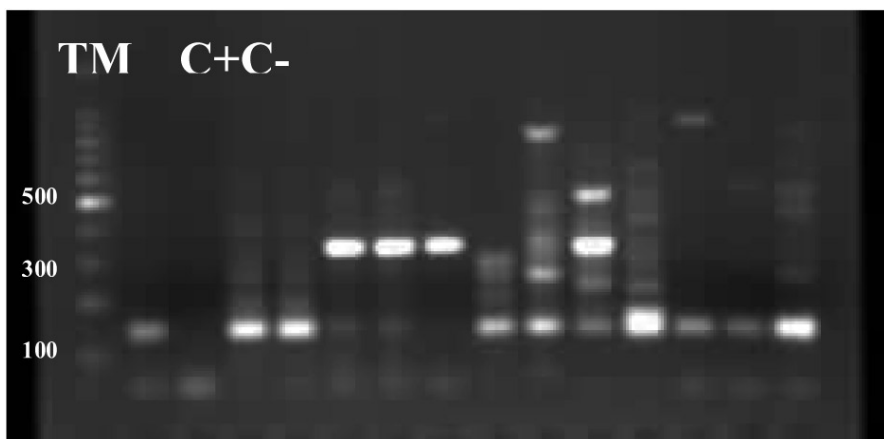


FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5 %. PCR para β -actina. TM= padrão de tamanho molecular 100 pb; C+= controle positivo; C-= controle negativo; canaletas 1-2= amostras positivas 130 pb (SK6); canaletas 3-5= amostras positivas 350 pb (BHK-21); canaletas 6, 7, 9-12= amostras positivas 130pb (C6/36, CC81, FEG, FLK, L929 e MA104); canaleta 8= amostra positiva 130 pb e 350 pb (CHO-K1).

A produção de antígenos em cultivos celulares contaminados com *Mycoplasma* spp poderia propiciar a formação de reações cruzadas com amostras de campo desse agente em técnicas sorológicas. Por isso, a necessidade de avaliação das linhagens/partidas celulares também na produção de antígenos, mostrando-se como um controle de qualidade fundamental no processo de fabricação de antígenos para exames sorológicos. O monitoramento contínuo de linhagens celulares pode dar subsídios aos programas de controle de qualidade implementados nos laboratórios de cultivo celular, uma vez que indicaria, em caso de contaminações repetidas, que as práticas e procedimentos laboratoriais precisariam ser revistos.

CONCLUSÃO

A metodologia adotada neste trabalho para a detecção de contaminantes do gênero *Mycoplasma* spp permitiu a sua utilização de maneira rápida e eficaz na rotina de monitoramento e introdução de linhagens/partidas celulares em laboratórios que utilizam cultivos celulares.

REFERÊNCIAS

- CHENG, H.S.; SHEN, C.W.; WANG, S.R. Effect of storage conditions on detection of mycoplasma in biopharmaceutical products. **In Vitro Cellular & Development Biology Animal**, v. 43, n. 3-4, p.113-119, 2007.
- GARNER, C.M.; HUBBOLD, L.M.; CHAKRABORTI, P.R. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. **British Journal of Biomedical Science**, v. 57, n. 4, p. 295-301, 2000.
- GERTZ, E.M.; YU, Y.K.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER, A.A.; ALTSCHUL, S.F. Composition-based statistics and translated nucleotide searches: improving the TBLASTN module of BLAST. **BMC Biology**, v. 4, p. 41, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- KONG, F.; JAMES, G.; GORDON, S.; ZELYNSKI, A.; GILBERT, G.L. Species-specific PCR for identification of common contaminant mollicutes in cell culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3195-3200, 2001.
- KONG, H.; VOLOKHOV, D. V.; GEORGE, J.; IKONO-MI, P.; CHANDLER, D.; ANDERSON, C.; CHIZHIKOV, V. Application of cell culture enrichment for improving the sensitivity of mycoplasma detection methods based on nucleic acid amplification technology (NAT). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 223-32, 2007.
- KUPPEVELD, F.J.M.; JOHANSSON, K.E.; GALAMA, J.M.D.; KISSING, J.; BÖLSKE, G.; LOGT, J.T.M.; MELCHERS, W.J.G. Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.1, p.149-152, 1994.
- MARIOTTI, E.; MIRABELLI, P.; DI NOTO, R.; FORTUNATO, G.; SALVATORE, F. Rapid detection of mycoplasma in continuous cell lines using a selective biochemical test. **Leukemia Research**, v. 32, n. 2, p. 323-326, 2007.
- McGARRITY, G.J.; KOTANI, H. Cell culture mycoplasmas. In: RAZIN, S.; BARILE, M.F. (Ed.). **The mycoplasmas**. v. 4. Mycoplasma pathogenicity. New York: Academic Press, 1985. p. 353-390.
- MONIWA, M.; CLAVIJO, A.; BEDDOME, S. Conventional reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of Foot-and-mouth disease virus (FMDV). **National Centre for foreign Animal Disease**, MB-PR-0-00, p. 9, 2005.
- O'CONNELL, R.C.; WITTLER, R.G.; FABER, J.E. Aerosols as a Source of Widespread Mycoplasma Contamination of Tissue Cultures. **Applied Microbiology**, v. 12, p. 337-342, 1964.
- OLSON, L.D.; BARILE, M.F. Mycoplasma infection of cell cultures: Isolation and detection. **Methods in Cell Science**, v.11, n.3, p.175-179, 1988.
- SUNG, H.; KANG, S.H.; BAE Y.J.; HONG, J.T.; CHUNG, Y.B.; LEE, C.K.; SONG, S. PCR-based detection of Mycoplasma species. **Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p.42-49, 2006.
- STACEY, A.; DOYLE, A. Routine testing of cell cultures and their products for mycoplasma contamination. In: POLLARD, J.W.; WALKER, J.M. (Eds.). **Basic cell culture protocols**. Totawa NJ: Humana Press Inc, 1997. p. 305-311.
- TIMENETSKY, J.; SANTOS, L.M.; BUZINHANI, M.; METTIFOGO, E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 907-914, 2006.

Protocolado em: 27 jul. 2007. Aceito em: 27 abr. 2008.