

**Tatiana Flávia Pinheiro de Oliveira**

**PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE  
CONTAMINANTES EM CULTIVOS CELULARES, SOROS E  
TRIPSINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Marcos Bryan Heinemann

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2012

048p

Oliveira, Tatiana Flávia Pinheiro de, 1986-  
Padronização e aplicação da PCR para detecção de contaminantes em cultivos celulares,  
soros e tripsinas / Tatiana Flávia Pinheiro de Oliveira. - 2012.  
79 p. : il.

Orientador: Marcos Bryan Heinemann

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

I. Reação em cadeia de polimerase - Teses. 2. Tripsina - Teses. 3. Micoplasma-  
Teses. 4. Soros - Teses. I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Universidade Federal de Minas  
Gerais. Escola de Veterinária. 11 I. Título.

CDD - 636.089 607 5

Dissertação defendida e aprovada em 05 de março de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Prof. Marcos Bryan Heinemann  
Presidente



---

Prof. Marcelo Fernandes Camargos



---

Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis



## DEDICATÓRIA

Esta dissertação de mestrado é dedicada a minha mãe (*in memoriam*) pelo exemplo de força, luta e perseverança, que me ensinou a nunca desistir, dizendo muitas vezes que por mais forte que a tempestade fosse; o sol sempre iluminará.

Guardarei sempre comigo o seu abraço puro e sincero quando soube da aprovação na seleção deste mestrado. Mãe, muito obrigada por tudo! Sinto muito sua falta!

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais uma conquista importante em minha vida.

A minha mãe que mostrou que a luta pode ser árdua, mas mesmo assim bela.

A minha família, em especial a minha irmã, que soube aceitar os momentos de abandono, como ela sempre dizia, para que fosse possível concluir este trabalho.

Ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais, na pessoa do Coordenador Ricardo Aurélio Pinto Nascimento e do coordenador da Divisão de Biossegurança, Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota pela liberação de execução deste trabalho nas dependências do LANAGRO-MG.

Ao Instituto Mineiro de Agropecuária, na pessoa do diretor-geral Altino Rodrigues Neto, também pela liberação para realização do mestrado.

Ao meu orientador, Professor Marcos Bryan Heinemann, pela confiança, prestatividade e orientação.

Aos integrantes da banca examinadora, Professor Jenner K. Pimenta dos Reis e Dr Marcelo Fernandes Camargos pelas sugestões de correção.

Ao Laboratório de Biologia Molecular (LBM), na pessoa dos responsáveis Antônio Augusto Fonseca Júnior e Ana Cláudia Pinto Cottorello. Muito obrigada Antônio pela orientação no laboratório e Ana, obrigada principalmente pela grande ajuda na reta final.

Ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV), representado por Anapolino Macedo de Oliveira e Marcelo Fernandes Camargos. Anapolino, muito obrigada pela ajuda fundamental na escrita deste trabalho, pelo apoio, carinho, preocupação e por fazer sentido às palavras que surgiam do meu pensamento. Marcelo, muito obrigada pela confiança, pelo convívio, pelo exemplo de profissional e ser humano que és.

Ao Laboratório de Cultivo Celular da Escola de Veterinária da UFMG, em especial a Doraci e Annita pela prestatividade.

Aos amigos do LBM, Estefânia, Ana, Michele, Nayara, Natanael, Antônio, Mariana, Érica, Carolina e Cristina, ou melhor, à Sociedade LBM, que me ajudaram com muito carinho. Em especial à Estefânia, Michele e Nayara, por tantos auxílios.

Ao amigo mais recente, Antonizete, pela ajuda na elaboração de gráficos, tabelas e formatação.

Aos amigos do LDDV, Lucília, Marconi, Érica Issa, Aládio, Natanel, Petrina, Jaqueline, Marcelo e Anapolino pelas prazerosas convivências, momentos de felicidade e apoio nas dificuldades.

Ao Ronaldo Sanches pela foto que enriqueceu o trabalho.

À Fernanda da Comunicação Social do LANAGRO-MG, pela liberação de uso da valiosa “salinha” que fez render tantas escritas.

À Vânia e João pela grande ajuda.

À Nádia Maria da Silva pela ajuda na formatação deste trabalho.

A todos os amigos que apoiaram e torceram pela finalização deste trabalho.

À FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

---

*“Hoje me sinto mais forte,  
Mais feliz, quem sabe,  
Só levo a certeza,  
De que muito pouco sei...”  
Almir Sater*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 LITERATURA CONSULTADA .....	15
2.1 História e importância do Cultivo Celular .....	15
2.2 Problemas associados às contaminações celulares .....	16
2.2.1 Transmissão de Doenças a partir de vacinas contaminadas .....	16
2.3 Origens das contaminações .....	17
2.3.1 Soros e tripsinas .....	18
2.4 Contaminantes biológicos - critérios para escolha dos contaminantes a serem testados .....	18
2.4.1 Vírus da Diarréia Bovina e Vírus .....	20
2.4.2 Micoplasmas .....	21
2.4.3 Circovírus Suíno .....	22
2.4.4 Parvovírus Suíno .....	23
2.4.5 Vírus da Leucose Enzootica Bovina .....	23
2.5 Técnicas utilizadas para detecção de contaminantes celulares .....	24
2.5.1 Órgãos regulamentadores - Técnicas recomendadas para detecção de contaminantes celulares .....	25
2.5.2 A PCR na detecção de contaminantes celulares .....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1 Local do Experimento .....	28
3.2 Amostras .....	28
3.2.1 Controles .....	28
3.2.2 Linhagens Celulares .....	29
3.2.3 Insumos: soros bovinos e tripsinas .....	30
3.3 Padronização dos Métodos .....	31
3.3.1 Extração do Material Genético .....	31
3.3.1.1 Extração de RNA .....	31
3.3.1.2 Extração de DNA .....	31
3.3.1.3 Dosagem de RNA e DNA .....	32
3.3.2 Reação em Cadeia pela Polimerase - PCR .....	32
3.3.2.1 PCR para avaliação da eficiência das extrações .....	32

3.3.2.2 PCR para detecção de contaminantes celulares.....	32
3.3.2.3 Iniciadores .....	33
3.3.2.3 Especificidade analítica dos iniciadores.....	34
3.3.2.4 Otimização das PCR .....	34
3.3.2.5 Condições de Amplificação .....	34
3.3.3 Análise dos Produtos das PCR .....	36
3.3.4 Avaliação das PCR .....	37
3.3.4.1 Especificidades dos produtos amplificados das PCR.....	37
3.3.4.1.1 Análise por sequenciamento.....	37
3.3.4.1.2 Análise por enzima de restrição.....	38
3.3.4.2 Sensibilidade Analítica das PCR.....	38
3.4 Sequenciamento em amostras de linhagens celulares .....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1 Padronização das PCR .....	38
4.1.1 PCR para avaliação da eficiência das extrações.....	38
4.1.2 PCR para detecção de contaminantes celulares.....	40
4.1.2.1 PCR para PPV .....	40
4.1.2.2 PCR para <i>Mycoplasma (Mollicutes)</i> .....	44
4.1.2.3 RT-PCRs para BVDV .....	47
4.1.2.4 PCR para PCV1 .....	49
4.1.2.5 PCR para BLV .....	52
4.2 Aplicações das PCR em amostras de linhagens celulares, soros bovinos e tripsinas....	53
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Curva de amplificação do gene beta-actina presente em MDBK Ct: 23,90 (curva em azul), DNA de bovino Ct: 25,78 (curva em verde) e PK15 Ct: 29,01 (curva em vermelho) através da PCR em tempo real baseado na tecnologia TaqMan®. Os traços nas cores roxo e cinza correspondem aos controles negativos da PCR (reagentes menos o DNA)..... 39

Figura 2-(A e B) – Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação de GAPDH do DNA de diferentes espécies de linhagens celulares em diferentes temperaturas de anelamento através da PCR para o gene GAPDH. Canaleta 1- DNA VERO. Canaleta 2- DNA PK15. Canaleta 3- DNA MDBK. Canaletas 4 e 5- DNA de bovino. Canaleta 6 - Controles negativos (reagentes menos o DNA). Canaleta 7- Padrão de tamanho molecular de 100 pb.. 40

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos produtos de 408 pb do PPV em diferentes temperaturas de anelamento. Canaleta 1: C+ PPV NADL-2



(Origem IPE3). Canaleta 2: C+ PPV cepa NADL-2 (Origem RO1). Canaletas 3 a 5: Controles negativos (reagentes menos o DNA). Canaleta 6: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. 41

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose *in silico* com o auxílio do programa computacional pDRAW32, mostrando os fragmentos gerados através das enzimas de restrição *HindIII* e *HphI*. Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 42

Figura 5 – Análise por enzima de restrição em eletroforese em Gel de agarose 2% dos produtos amplificados do DNA de PPV. Canaleta 1- Produto clivado pela ação da enzima *HphI*. Canaleta 2- Produto clivado pela ação da *HindIII*. Canaleta 3: Produto amplificado do C+ de PPV sem restrição enzimática. Canaleta 4- Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 42

Figura 6 - Sensibilidade analítica da PCR para PPV com diluições seriadas do DNA desse agente em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Canaletas de 1 a 10 - Diluição do DNA de PPV de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Canaletas 11 e 12 - Controles negativos contendo reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 13 - Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 43

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a especificidade analítica dos iniciadores utilizados na PCR para *Mycoplasma (Mollicutes)*. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: DNA do *M. bovis genitalium*. Canaleta 3: DNA do *M. hyopneumoniae*. Canaleta 4: DNA do *M. mycoides* subespécie *mycoides small colony (MmSC)*. Canaleta 5: DNA de suíno. Canaleta 6: DNA de bovino. Canaletas 7 e 8: Controles negativos contendo somente reagentes da PCR. .... 44

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose apresentando a sensibilidade analítica da PCR para *Mycoplasma (Mollicutes)* com diluições seriadas do DNA desse agente. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaletas de 2 a 7: Diluição do DNA de *M. bovis genitalium* de 1:5 a 1:15625 (na base 5). Canaletas 8 e 9: Controles negativos contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 10: DNA de *M. bovis genitalium* (puro). Canaleta 11: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 45

Figura 9 - Método de coloração Hoescht 33258. A: Presença do DNA de micoplasma não evidenciada na célula BHK. B: Presença do DNA de micoplasma detectada na célula MDBK indicadas pelas setas. .... 46

Figura 10 - Especificidade dos iniciadores das RT-PCRs em tempo real e convencional para o BVDV. 10a: Curva de amplificação da especificidade analítica dos iniciadores. Curva em azul - Ct: 28,64 (RNA controle positivo BVDV). Curva em verde - Ct: 33,00 (RNA cepa NADL BVDV). Equipamento Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Austrália). 10b: Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a especificidade analítica dos iniciadores da PCR convencional para BVDV. Canaleta 1: RNA vírus da PSC cepa Bréscia. Canaleta 2: RNA de bovino. Canaleta 3: RNA de suíno. Canaleta 4: RNA cepa NADL BVDV. Canaleta 5: RNA controle positivo. Canaleta 6: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 47

Figura 11 - Sensibilidade analítica das RT-PCRs para o BVDV a partir de diluições seriadas do RNA do controle positivo. 11a: Cepa BVDV não citopática W2 utilizada na determinação da sensibilidade analítica das RT-PCR, titulada e visualizada pela técnica de imunoperoxidase (aumento 100x). 11b: Curva de amplificação das diluições seriadas do RNA do controle positivo (C+) de BVDV ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) constando as curvas do RNA C+ puro (Ct: 26,33), RNA C+  $10^{-1}$  (Ct: 31,08), RNA C+  $10^{-2}$  (Ct: 33,63), RNA C+  $10^{-3}$  (Ct: 38,30). Foram utilizados dois controles negativos contendo os reagentes da PCR menos DNA. Equipamento Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Austrália). 11c: Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a sensibilidade analítica da PCR convencional para BVDV com diluições seriadas do RNA do

controle positivo. Canaletas de 1 a 8: Diluição do RNA de BVDV de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ . Canaletas 9 a 11: Controles negativos contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 12: Padrão de tamanho molecular de 100 pb..... 48

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % apresentando a amplificação do DNA do controle positivo de PCV1. Canaleta 1: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 2: DNA do PCV1. Canaleta 3: Padrão de tamanho molecular de 100 pb ..... 50

Figura 13 - **A.** Eletroforese em gel de agarose *in silico* com o auxílio do programa computacional pDRAW32 mostrando os fragmentos gerados através da enzima de restrição *HpaI*. Padrão de tamanho molecular de 100 pb. **B.** Eletroforese em Gel de agarose 2% apresentando análise por enzima de restrição do DNA de PCV1. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: Produto amplificado do C+ de PCV1 sem restrição enzimática. Canaleta 3: Produto clivado pela ação da enzima *HpaI*..... 51

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a sensibilidade analítica da PCR para PCV1 com diluições seriadas do DNA desse agente. Canaletas de 1 a 10: Diluição do DNA de PCV1 de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Canaleta 11: DNA de PCV1 (puro). Canaleta 12: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 13: Padrão de tamanho molecular de 100 pb..... 51

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando os produtos amplificados da PCR externa (**a**) e interna (**b**) para o BLV. Canaletas 1: Controle positivo de BLV. Canaletas 2 e 3: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaletas 4: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 52

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a sensibilidade analítica da nested-PCR para BLV com diluições seriadas do DNA desse agente. Canaletas de 1 a 10: Diluição do DNA de BLV de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Canaletas 11 e 12: Controle negativo contendo reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 13: Controle positivo de BLV. Canaleta 14: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 15: Padrão de tamanho molecular de 50 pb. .... 53

Figura 17 - Curva de amplificação do gene beta-actina presente em amostras DNA de soros bovinos e tripsinas através da PCR em tempo real baseado na tecnologia TaqMan®. Equipamento Real Time PCR 7500® Fast System (Applied Biosystems, EUA)..... 54

Figura 18: Número de culturas celulares detectadas com DNA de *Mycoplasma* (*Mollicutes*) em relação ao número de amostras processadas por laboratório..... 57

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos DNA das amostras do laboratório IPE3 pela PCR para *Mycoplasma* (*Mollicutes*). Canaletas 1-4, 6, 8-10: Amostras não detectadas (SF21, N2A, FLK, McCoy, RK13, MDBK, BHK e VERO). Canaletas 5, 7 e 12: Amostras detectadas (IBRS2, FLK e BGM). Canaleta 11: Controle da extração. Canaleta 13: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 14: *M. bovis genitalium* (C+). Canaleta 15: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 57

Figura 20: Número de culturas celulares detectadas com genoma de PCV1 em relação ao número de amostras processadas por laboratório..... 59

Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos DNA das amostras do laboratório IPE3 através da PCR para PCV1. Canaletas 1, 4-8: Amostras detectadas (FLK, PK15, PK15, PK15, SK6 e ST). Canaletas 2 e 9: Controle da extração.

Canaleta 3: Amostra não detectada (PK15) Canaleta 10: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 11: Controle positivo de PCV1. Canaleta 12: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. As setas indicam bandas menos intensas, mas do tamanho esperado para o PCV1..... 59

Figura 22: Número de culturas celulares detectadas com genoma de BVDV em relação ao número de amostras processadas por laboratório..... 61

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos DNA das amostras dos laboratórios RO1 e IPE3 através da PCR para BVDV. Canaletas 1, 8 e 10: Amostras não detectadas (MDBK, INT407 e BT). Canaletas 2 e 4-7: Amostras detectadas (SK6, IBRS2, MDBK, CC 81 e RAW). Canaletas 3 e 9: Controle da extração. Canaleta 11: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 12: Cepa não citopática BVDV (C+). Canaleta 13: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 61

Figura 24: Número de culturas celulares detectadas com DNA de PPV em relação ao número de amostras processadas por laboratório..... 63

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos DNA das amostras do laboratório IPE3 através da PCR para PPV. Canaletas 1, 2, 4, 7-9, 11 e 12: Amostras detectadas: (SF21, N2A, McCoy, RK13, FLK, MDBK, BHK e BSC). Canaletas 3 e 6: Amostras não detectadas: (EBTr e IBRS2). Canaleta 5: Controle da extração. Canaletas 10 e 13: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 14: Controle positivo PPV cepa NADL. Canaleta 15: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 64

Figura 26- Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do transcrito da NS2 do PPV através da RT-PCR em amostras de RNA de algumas culturas celulares. Canaleta 1: RNA PK15. Canaleta 2: RNA SK6. Canaleta 3: RNA controle da extração. Canaleta 4: RNA BHK21. Canaleta 5: RNA VERO. Canaletas 6 e 7: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 8: RNA PPV. Canaleta 9: DNA PPV. Canaleta 10: Padrão de tamanho molecular de 100 pb..... 65

Figura 27- Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando o produto da amplificação da PCR realizada a partir do DNA de duas culturas celulares. Canaleta 1: DNA SK6 Canaleta 2: DNA VERO. Canaletas 3 e 4: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 5: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. .... 66

Figura 28 – Curva de amplificação do gene da VP2 do PPV obtida através da PCR em tempo real *Prime Time*. Aparelho Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Austrália). .... 67

Figura 29 - Distribuição dos agentes propostos neste estudo detectados no total de amostras analisadas. .... 70

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1- Vírus recomendados a serem pesquisados em soro bovino e tripsina ..... 19

Tabela 2- Contaminantes celulares descritos na literatura e órgãos regulamentadores, tipo de amostra analisada e Referência..... 20

Tabela 3 - Informações sobre os controles positivos utilizados..... 29

---

Tabela 4 - Espécie, tipo de linhagem celular, tecido de origem e número de linhagens por laboratório analisadas para a pesquisa de contaminantes.....	30
Tabela 5 - Identificação dos laboratórios e insumos enviados para pesquisa de contaminantes celulares por fabricante.....	31
Tabela 6 - Descrição dos iniciadores utilizados, informações dos produtos amplificados e referência.....	33
Tabela 7 - DNA dos agentes utilizados para avaliação da especificidade dos iniciadores .....	34
Tabela 8- Descrições das reações, termocicladores utilizados e condições dos ciclos das PCR utilizadas.....	35
Tabela 9 – Enzimas de restrição <i>HindIII</i> e <i>HphI</i> e suas informações como número de cortes, posição do sítio de clivagem e sequência de reconhecimento.....	42
Tabela 10 - Detecção de Micoplasmas ( <i>Mollicutes</i> ) em amostras de culturas celulares por PCR e coloração de Hoescht 33258.....	46
Tabela 11- Resultados encontrados por agente contaminante nas linhagens celulares dos laboratórios participantes .....	55
Tabela 12 - Resultados encontrados por agente contaminante nas amostras de soros dos laboratórios RO1, RO2, RO3, RO5 e IPE3. ....	68
Tabela 13- Resultados encontrados por agente contaminante nas amostras de tripsinas dos laboratórios RO1, RO2, RO3, RO5 e IPE3 .....	69

---

## RESUMO

O presente trabalho objetivou a padronização e aplicação de PCR para detecção de contaminantes em cultivos celulares, soros e tripsinas. Foram padronizadas um total de seis PCR para avaliar a presença do material genético de *Mycoplasma* (*Mollicutes*), Parvovírus Suíno (PPV), Circovírus Suíno tipo 1 (PCV1), vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV) e vírus da Diarréia Bovina a Vírus (BVDV) (dois ensaios). Foram ainda padronizadas duas PCR para os genes GAPDH e  $\beta$ -actina para avaliar a eficiência das extrações dos materiais genéticos. A especificidade dos iniciadores, as sensibilidades e especificidades analíticas das PCR, com a realização de sequenciamento e análise de restrição enzimática foram avaliadas na etapa das padronizações das PCR. Após as padronizações, as PCR foram aplicadas em 88 amostras de cultura celular provenientes de oito laboratórios, pertencentes a redes oficiais e instituições de ensino e de pesquisa. Foram ainda analisadas 10 amostras de tripsinas de lotes diferentes e 13 amostras de soros bovinos de lotes diferentes de alguns dos laboratórios que enviaram as culturas celulares. A ocorrência dos materiais genéticos dos contaminantes celulares foi de 34,1% *Mycoplasma*- *Mollicutes*; 59,1% PPV; 35,2% PCV1; 23,9% BVDV e 3,4% BLV. Nas amostras de soros bovinos e tripsinas avaliadas, foram detectados o material genético do BVDV, PCV e PPV. Para confirmar a especificidade dos produtos amplificados das PCR de algumas amostras de culturas celulares foi realizado o sequenciamento. As PCR padronizadas neste estudo permitiram detectar os contaminantes propostos nas amostras de culturas celulares, soros e tripsinas de forma rápida, específica e sensível, recomendando-se, pois, suas aplicações em caráter de rotina para laboratórios que trabalham com culturas celulares e seus insumos.

Palavras-chave: Culturas Celulares, Soros, Tripsinas, PCR, *Mycoplasma*, PPV, PCV1, BLV, BVDV.

## ABSTRACT

The aim of this study was the standardization of PCR and the evaluation of their use to detect contaminants in cell cultures, sera and trypsin. A total of six PCR reactions were developed for detection of *Mycoplasma* (*Mollicutes*), PPV, PCV1, BLV and BVDV (two assays). Two PCR assays were also standardized, for GAPDH and  $\beta$ -actin genes, to evaluate the efficiency of genetic material extraction. During standardization the specificity of primers, the analytical sensitivity and the analytical specificity were evaluated by amplicon restriction analyses and sequencing. After standardization, the PCR were applied to 88 cell culture samples from eight laboratories, belonging to official laboratories network and to education and research laboratories. We also analyzed 10 different batches of trypsin and 13 different batches of bovine sera, supplied by the same laboratories. Our results showed the occurrence of following DNA cell culture contamination: 34.1% for *Mycoplasma*- *Mollicutes*; 59.1% for PPV; 35.2% for PCV1; 23.9% for BVDV and 3.4% for BLV. In bovine sera and trypsin samples DNA of BVDV, PCV and PPV was detected. To confirm the specificity of the PCR reactions, some cell cultures samples (amplicons) were sequenced. The PCR reactions standardized in this study allowed the detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin samples, and could be used in a routine basis in laboratories working with these materials.

Keywords: Cell culture, Sera, Trypsins, PCR, *Mycoplasma*, PPV, PCV1, BLV, BVDV.

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo celular é um recurso imprescindível na pesquisa acadêmica e na biotecnologia, sendo amplamente utilizado em métodos de diagnóstico em virologia, manutenção de amostras biológicas, como estirpes virais, produção de vacinas, proteínas recombinantes e biofármacos.

As culturas celulares, utilizadas no diagnóstico e na produção de vacinas, devem ser puras e livres de contaminantes. Culturas celulares contaminadas podem trazer consequências indesejáveis como a perda da credibilidade científica, a invalidação de resultados e a desvalorização de produtos e medicamentos.

As contaminações celulares são ocasionadas por agentes biológicos e ou químicos. Os contaminantes biológicos mais comumente encontrados em células são micoplasmas, vírus, bactérias e leveduras, sendo que, na maioria dos casos, a contaminação pode ocorrer sem o conhecimento do analista.

A presença de bactérias e leveduras, nos cultivos celulares, é facilmente detectada macro e microscopicamente. Contudo, contaminações provenientes de agentes como micoplasma e vírus podem passar despercebidas, proporcionando alterações nas células infectadas como redução da taxa de crescimento, alterações morfológicas, cromossômicas e do metabolismo dos aminoácidos e ácidos nucléicos.

As fontes de contaminação biológica das linhagens celulares envolvem principalmente a aquisição de culturas já contaminadas, bem como de insumos utilizados na manutenção das mesmas. Estes insumos, que incluem soros e tripsinas, por serem usualmente de origem animal, tornam-se uma importante fonte de contaminação. Procedimentos inadequados de manipulação devem também ser considerados.

O monitoramento das culturas celulares com testes para verificação de contaminação é essencial, ainda que existam procedimentos de assepsia no local de trabalho com as células. Metodologias que podem ser utilizadas na detecção de contaminações celulares incluem a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Isolamento em Meio de Cultura, Ensaio de Detecção de Níveis de Anticorpos frente a agentes específicos, dentre outros.

A PCR é considerada uma técnica promissora na detecção de contaminantes celulares por ser rápida, apresentar robustez, elevada sensibilidade e especificidade analítica e diagnóstica. Devido ao fato de muitos agentes infecciosos não serem facilmente cultiváveis, a PCR tem se mostrado uma metodologia interessante para a detecção e controle de contaminantes biológicos em cultivo celular e seus insumos.

Órgãos regulamentadores como o *Food Drug Administration* (FDA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomendam, dentre outras técnicas, a utilização da PCR para detecção de contaminantes celulares acidentais, em especial na detecção de agentes que não causam efeito citopático ou que infectam as células de forma latente.

Observando-se a relevância dos efeitos causados pelos contaminantes celulares principalmente no diagnóstico virológico e o fato de que a PCR pode ser uma ferramenta útil na detecção destes contaminantes, o presente trabalho objetivou padronizar técnicas de PCR para uso na rotina de detecção de Micoplasma (*Mollicutes*), Circovírus Suíno tipo 1, vírus da Diarréia Bovina a Vírus, Parvovírus Suíno e vírus da Leucose Enzoótica Bovina e avaliar a ocorrência destes em amostras de cultivos celulares, soros bovinos e tripsinas.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

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 (Terminology..., 2011; Mahy, 2009). Em geral, os cultivos celulares são realizados através da desagregação do tecido original, cultura primária ou linhagens celulares por processos químicos, mecânicos ou enzimáticos de forma a obter células isoladas com capacidade de multiplicação (Freshney, 1994). Existem dois tipos de culturas de células: i) Culturas Primárias e ii) Linhagens Celulares (Freshney, 2006).

As Culturas Primárias são obtidas por meio da remoção do órgão fresco, em sua maioria de um embrião ou feto, os quais são fracionados, principalmente através da ação de enzimas proteolíticas como tripsinas e colagenases, até a individualização dos grupos celulares. O processo de crescimento é lento, necessitando de subcultivos periódicos. A grande desvantagem neste processo é que após um número restrito de passagens (subcultivo) as células começam a apresentar taxas reduzidas de multiplicação, podendo enfim cessar a divisão celular. Outra desvantagem é a de o processo ser mais trabalhoso e com maiores possibilidades de contaminação, além da heterogeneidade celular. Já a principal vantagem é a maior sensibilidade que as células de cultivo primário possuem frente a uma infecção viral (Ryan, 2003; Brum e Weiblen, 2007).

As Linhagens Celulares são obtidas a partir de culturas primárias. Estas podem apresentar um tempo restrito de vida ou multiplicarem de forma contínua, sendo estas últimas denominadas de linhagens contínuas. As linhagens contínuas são obtidas de células tumorais ou de tecidos normais que sofreram transformação *in vitro*. As principais vantagens deste tipo de cultivo são o alto poder de multiplicação, ou seja, permite séries intermináveis de subcultivos se cultivadas em condições

apropriadas, são homogêneas, estáveis e de fácil manuseio. Como desvantagens, podem possuir uma menor sensibilidade à infecção viral do que as células primárias, devido às modificações morfológicas e fisiológicas (Freshney, 1994; Brum e Weiblen, 2007; Flores, 2007; Langdon, 2008; Mahy, 2009).

### 2.1 História e importância do Cultivo Celular

O Cultivo de Célula se iniciou em 1907 por Ross Harrison quando tentava provar a origem das fibras nervosas. Para isso observou essas células fora do organismo, levando em consideração as necessidades básicas de uma célula, e desenvolveu um experimento que mimetizava tais condições. Harrison, com o cuidado de manter as condições assépticas, dissecou o tubo medular de um embrião de sapo e o mergulhou em sua linfa fresca que logo coagulou. Em seguida, selou o frasco com parafina, observando a sua preparação ao microscópio todos os dias. Com esse experimento, Harrison havia encontrado a resposta para a procedência da fibra nervosa: ela nascia da própria célula nervosa (Friedman e Friedland, 2006; Alves e Guimarães, 2010).

Após o achado de Harrison outros cientistas passaram a se interessar por esse modelo de experimento, introduzindo o uso de cultura de células em suas pesquisas. Alexis Carrel, em 1912, desenvolveu um modelo a partir de células cardíacas de embrião de galinha para o cultivo. George Gey e sua esposa Margaret, em 1951, cultivaram células de uma amostra de câncer de colo de útero de uma mulher de 31 anos, chamada Henrietta Lacks, estabelecendo a linhagem HeLa, utilizada até hoje em todo mundo (Alves e Guimarães, 2010).

As culturas de células animais se tornaram efetivamente disponíveis somente no período compreendido entre o final da década de 40 e início da década de 50 do século XX. Esse fato pode ser explicado primeiramente pelo desenvolvimento de antibióticos, que facilitaram o processo de cultura celular e evitaram muitos problemas

inerentes a contaminações destas culturas. Além disso, verificou-se a melhoria das técnicas com o uso de tripsina para remoção de células necessárias para obtenção de linhagens celulares em crescimento e por último, o surgimento de linhagens celulares padronizadas com meios de cultura quimicamente definidos, facilitando ainda mais o processo de cultura celular (Ryan, 2003).

A descoberta das culturas celulares possibilitou o estudo dos organismos vivos ao nível celular e mesmo molecular, permitindo avanços nas áreas de biologia celular e molecular; fisiologia e bioquímica da célula. Proporcionou, ainda, o desenvolvimento de modernas vacinas, inclusive as que imunizam contra a poliomielite, o sarampo, a caxumba e a raiva (Freshney, 2002; Friedman e Friedland, 2006; Langdon, 2008).

As culturas celulares são amplamente utilizadas no meio acadêmico e industrial, sendo empregadas em métodos de diagnóstico virológico, manutenção de estirpes virais, produção de vacinas, proteínas recombinantes e biofármacos (Camargos *et al.*, 2008; Langdon, 2008). Podem também ser utilizadas em modelos para estudo de doenças como as neoplasias (Jones *et al.*, 2008), como ferramentas em testes de atividade farmacológica e mecanismo de ação de drogas (Combes, 2004).

Apesar da diversidade de aplicações, a utilização de culturas celulares pode ser comprometida, caso sejam detectadas contaminações. As contaminações celulares podem ser ocasionadas por agentes biológicos, como micoplasmas, vírus, bactérias, fungos e outras células (contaminação cruzada) ou provocadas por agentes químicos como metais, endotoxinas, outras impurezas encontradas na própria cultura celular, água, meios e soros (Ryan, 1994).

## **2.2 Problemas associados às contaminações celulares**

As contaminações celulares não são facilmente eliminadas, provocando uma série de consequências que envolvem a série de prejuízos financeiros e esforço despendido no desenvolvimento de experimentos (Brinzeu *et al.*, 2008). Em casos mais graves, a descoberta dos contaminantes pode colocar em questionamento trabalhos passados ou atuais, proporcionar perdas de culturas celulares ou até mesmo de experimentos inteiros (Ryan, 1994).

A credibilidade científica pode se tornar ameaçada com a existência de relatos de contaminações, os quais são capazes de invalidar resultados e desvalorizar produtos e medicamentos (Master, 2002). Células contaminadas podem apresentar alterações na susceptibilidade de infecção por outros agentes, gerando resultados falso-negativos (Merten, 2002) e falso-positivos.

As culturas celulares contaminadas por agentes como micoplasmas podem apresentar alterações em suas células infectadas como redução da taxa de crescimento, alterações morfológicas, cromossômicas e do metabolismo dos aminoácidos e ácidos nucleicos (Langdon, 2004).

Os contaminantes celulares podem interferir ainda no diagnóstico de infecções virais e, vacinas produzidas utilizando culturas celulares contaminadas podem levar a soroconversão ou doenças em humanos ou animais vacinados (Ryan, 1994; Weissman e Levings, 1998; Merten, 2002).

### **2.2.1 Transmissão de Doenças a partir de vacinas contaminadas**

A seleção de cultivos de células apropriados para uso na produção de produtos biológicos tem sido um foco recorrente de atenção e ansiedade nos últimos 50 anos. Questionamentos como “O produto fabricado a partir de uma determinada célula será seguro para seres humanos?” sempre existiram. A possibilidade da



transmissão de agentes microbianos presentes em produtos biológicos resultarem em infecção, câncer ou outro tipo de doença é evidente (Petricciani e Sheets, 2008).

Em animais vacinados, várias doenças já foram relatadas devido à utilização de vacinas de vírus atenuados de uso veterinário contaminadas com outros agentes biológicos. Vacinas contra os vírus da Peste Suína Clássica, Rinotraqueíte Infeciosa Bovina, vírus Respiratório Sincicial dos Bovinos contaminadas com o vírus da Diarréia Bovina a Vírus (BVDV) têm sido responsáveis por infecção em leitões vacinados ou pela origem de surtos da doença em bovinos (Pastoret *et al.*, 2010). Segundo Wilbur *et al.* (1994), casos de vacinas caninas contaminadas com o vírus da Língua Azul conduziram a morte e abortos em cadelas.

A importância da presença de contaminantes em vacinas pode ser subestimada (Kulcsar *et al.*, 2010). Recentemente, o Circovírus suíno tipo 1 (PCV1) foi detectado em uma vacina comercial contra a rotavirose humana e foi confirmado também que o mesmo estava presente na célula estoque utilizada para produção da vacina (Durham, 2010). O caso recente de contaminação da vacina com PCV1 reforça a necessidade de esforços contínuos para reduzir a probabilidade de introdução de vírus de origem animal em materiais utilizados na fabricação de produtos biológicos tanto para animais como para o homem (Ma *et al.*, 2011).

Algumas estratégias como o vírus vacinal ser cultivado em células de espécies diferentes das espécies alvos das vacinas são propostas na tentativa de aumentar a segurança (Pastoret *et al.*, 2010). Entretanto, há relatos de vacinas contra o vírus da Doença de Aujeszky produzidas em células de ovelha contaminadas com o vírus da Doença das Fronteiras, causando a infecção e conseqüentemente produzindo anticorpos que têm reação cruzada para o vírus da Peste Suína Clássica, gerando resultados falsos-positivos no diagnóstico

sorológico da Peste Suína Clássica (Pastoret *et al.*, 1997).

### 2.3 Origens das contaminações

A fim de evitar ou reduzir as incidências de contaminações é importante o conhecimento, não somente da natureza e identidade dos contaminantes, mas também das fontes de contaminações (Ryan, 1994).

As fontes de contaminação biológica são diversas e incluem a utilização de culturas contaminadas, as quais são utilizadas para produzir outras células, como as culturas primárias que dão origem às linhagens celulares e podem carrear agentes provenientes do animal doador (Coriell, 1973).

Erros de identificação durante a manipulação das culturas celulares, controle inadequado de armazenagem das mesmas e uso múltiplo de linhagens celulares podem resultar em contaminação cruzada, que implica na contaminação de uma linhagem celular com outra (Shimada, 2005). Este tipo de contaminação pode ser capaz de introduzir agentes que estavam presentes em uma linhagem à outra, principalmente quando as linhagens são utilizadas para produção de vírus (Merten, 2002).

Outras fontes de contaminação de extrema importância são os insumos utilizados para o crescimento e manutenção das células, como meios de cultura, soros e tripsinas (Langdon, 2004). Materiais utilizados na manipulação das células como garrafas, pipetas, ponteiras também podem ser responsáveis pela contaminação celular e em geral, devem ser esterilizados antes da sua utilização (Mirjalili *et al.*, 2005).

A realização de procedimentos inadequados de manipulação também é responsável pela introdução de contaminantes nas culturas celulares (Merten, 2002; Cobo *et al.*, 2005). Práticas e procedimentos envolvendo a manipulação de células devem ser realizados segundo normas de biossegurança já preconizadas. Para a manipulação de células humanas e outros

primatas, devem ser usadas as práticas e a contenção do nível de biossegurança 2, com utilização de cabine de segurança biológica, descontaminação por desinfecção e autoclavação de todo material a ser descartado (Biossegurança, 2006).

### 2.3.1 Soros e tripsinas

Os soros e tripsinas são insumos de origem animal que permitem a manutenção de cultivos celulares. Os soros mais amplamente utilizados são os de bovinos adultos, recém-nascidos ou ainda de origem fetal (Brunner *et al.*, 2010). Já as tripsinas são extraídas geralmente de pâncreas de suínos (Merten, 2002).

O soro é utilizado como suplemento de meios de cultura, pois contém a maioria dos fatores necessários para o crescimento celular. O percentual de soro adicionado ao meio varia de 5-20%. Este insumo contém também hormônios, proteínas transportadoras e de ligação, lipídeos, cofatores enzimáticos, inibidores para a ação da tripsina, dentre outros (Langdon, 2008).

A tripsina é uma enzima responsável pela dissociação celular, necessária para realização de culturas celulares. Em geral, a utilização de tripsinas ocorre quando a confluência celular está em torno de 90 a 100%, necessitando de um subcultivo para evitar a morte celular (Brinzeu *et al.*, 2008; Brunner *et al.*, 2010).

A obtenção da tripsina se dá a partir de extratos pancreáticos de suínos, sendo geralmente empregados métodos cromatográficos que resultam em sua elevada purificação. Entretanto, a permanência de algumas enzimas pancreáticas suínas como nucleases, glicosilases e lipases, além da própria atividade enzimática da tripsina, pode contribuir para a inativação de vírus presentes nesse insumo (Marcus-Sekura *et al.*, 2011).

Embora essenciais às culturas celulares, os soros e tripsinas podem se tornar

prejudiciais por serem uma potencial fonte de contaminação por agentes biológicos (Langdon, 2004). A inativação destes insumos e a realização de extensivas verificações de contaminantes são recomendadas a fim de evitar a introdução de agentes nas células (Eloit, 1997).

### 2.4 Contaminantes biológicos - critérios para escolha dos contaminantes a serem testados

Os contaminantes biológicos podem ser divididos em dois grupos de acordo com a dificuldade de detecção nas culturas celulares. Bactérias, fungos e leveduras constituem o grupo dos agentes mais facilmente detectados. O outro grupo, portanto, possui contaminantes que são de difícil detecção como vírus, micoplasmas, protozoários e outras células (Ryan, 1994). Contaminações ocasionadas por bactérias e leveduras são mais fáceis de serem detectadas quando comparadas com as provocadas por micoplasmas e vírus, principalmente pelo fato destes agentes não serem detectados por macro e microscopia (Merten, 2002; Ryan, 1994; Freshney, 1994).

Alguns critérios de escolha de quais contaminantes celulares devem ser testados variam de acordo com o tipo e origem do material utilizado ou ainda podem estar relacionados com descrições na literatura. São recomendados, por exemplo, testes para todos os possíveis vírus de humanos quando se trabalha com linhagem celular de origem humana (Merten, 2002). Diversos vírus murinos têm sido selecionados para pesquisa como contaminantes em linhagens celulares de camundongo e amostras de tumores transplantados, pelo fato de serem patógenos de cobaias ou simplesmente por existirem relatos de contaminações celulares por estes agentes (Bauer *et al.*, 2004).

O mesmo ocorre com insumos como soros de bovino, aos quais são propostos testes de controle de qualidade para detecção de todos os possíveis vírus que infectam bovinos. Entretanto, estes testes se tornam inviáveis por razões econômicas e em

muitos casos, não são necessários. A realização de ensaios de detecção é aconselhável para vírus ubíquos e cujos riscos são conhecidos, como o vírus da Diarréia Bovina a Vírus (BVDV) em soro bovino (Merten, 2002).

Outro fator importante é a origem geográfica do soro bovino que pode indicar a

necessidade de testes de detecção de outros vírus (Merten, 2002). A tabela 1 apresenta uma série de agentes virais descritos na literatura recomendados a serem testados em insumos como tripsinas e soros utilizados na produção de produtos biológicos para uso humano.

Tabela 1- Vírus recomendados a serem pesquisados em soro bovino e tripsina

Soro bovino	Tripsina
Adenovírus (grupo 1 e 2)	Adenovírus suíno
Akabane vírus	Vírus da Peste Suína Africana
Coronavírus bovino	Vírus da Doença de Aujeszky
Vírus da Febre Efêmera de bovinos	Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína
Vírus da Língua Azul	<b>Vírus da Diarréia Bovina a Vírus<sup>1</sup></b>
<b>Vírus da Leucose Enzoótica Bovina<sup>1</sup></b>	Vírus da Peste Suína Clássica
Vírus da Imunodeficiência Bovina	Vírus da Encefalomiocardite
Vírus Respiratório Sincicial Bovino	Vírus da Influenza
<b>Vírus da Diarréia Bovina a Vírus<sup>1</sup></b>	<b>Parvovírus suíno<sup>1</sup></b>
Vírus da febre do Vale do Rift	Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos
Vírus da estomatite vesicular (Indiana e New Jersey)	Vírus da estomatite vesicular (Indiana e New Jersey)
Herpesvírus bovino tipo 1,2 e 4	Vírus da gastroenterite transmissível dos suínos
Vírus da Febre Catarral Maligna	Coronavírus Respiratório (Variante)
Vírus Parainfluenza bovino tipo 3	Enterovírus suíno (incluindo vírus da doença de Teschen Taflan)
<i>Poliomavírus bovino</i>	Vírus do exantema vesicular dos suínos
	Vírus da doença vesicular suína

Os vírus em itálico são recomendados a serem testados independentes da região geográfica dos insumos. Fonte: adaptada de Eloit (1997) citado por Merten (2002). <sup>1</sup> Destina-se a alguns dos agentes que foram pesquisados no presente trabalho.

Vírus de bovinos e suínos são recomendados a serem testados em linhagens celulares de mamíferos presentes em bancos de células, somente se matérias-primas de origem bovina e suína forem utilizadas (Schiff, 2005).

Os contaminantes podem ser detectados em um tipo específico de linhagem celular ou até mesmo estarem presentes em diferentes linhagens. Os micoplasmas são considerados os contaminantes celulares mais comumente encontrados, sendo detectados com grande frequência em células animais cultivadas *in vitro* (Nakai et

al., 2000; Mirjalili et al., 2005; Timenetsky et al., 2006; Camargos et al., 2008). O *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans* e *Mycoplasma hominis* são detectados em culturas celulares, geralmente relacionados com os analistas, pois são fisiologicamente encontrados no trato orofaríngeo de humanos (Hay, 1991). O *Mycoplasma hyorhinis* pode ser encontrado em insumos como tripsinas de origem suína (Polak-Vogelzang et al., 1990).

O BVDV também pode ser encontrado em diversas espécies de linhagens celulares, indicando que sua susceptibilidade não é

previsível, pois o vírus não é detectado somente em células de bovino (Merten, 2002).

Agentes infecciosos como o vírus MVM (Minute Virus of Mice) pertencente à família *Parvoviridae*, PVM (Pneumonia Virus of Mice) e vírus Sendai, pertencentes à família *Paramyxoviridae*, várias espécies de micoplasmas, dentre outros, são comumente encontrados em linhagens celulares de camundongo (Ayrál *et al.*, 2006).

A tabela 2 ilustra os agentes estudados neste trabalho. Esses agentes foram descritos na literatura e órgãos regulamentadores como o *Food Drug Administration* (FDA), *The International Conference on Harmonisation* (ICH) e Organização Mundial de Saúde (WHO) como contaminantes celulares, recomendados a serem testados em linhagens celulares, insumos e vacinas.

Tabela 2- Contaminantes celulares descritos na literatura e órgãos regulamentadores, tipo de amostra analisada e Referência

Contaminantes	Amostras analisadas		
	Soro ou tripsina	Cultivos celulares	Vacinas
Vírus da Diarréia Bovina a Vírus	Levings e Wessman (1991); Makoschey <i>et al.</i> (2003); Eloit (1997)	Levings e Wessman (1991); Bolin <i>et al.</i> (1994); Audet <i>et al.</i> (2000)	Levings e Wessman (1991); Audet <i>et al.</i> (2000); Studer <i>et al.</i> (2002)
Mycoplasma ssp.	Characterization... (2010); Dvorakova <i>et al.</i> (2005)	Peredeltchouk <i>et al.</i> (2011); Miyaki <i>et al.</i> (1989); Camargos <i>et al.</i> (2008); Timenetsky <i>et al.</i> (2006).	Sasaki <i>et al.</i> (1996); Code...(2012)
Circovirus Suíno	Plavsic (2001) Kumar <i>et al.</i> (2012)	Ma <i>et al.</i> (2011); Kumar <i>et al.</i> (2012)	Quintana <i>et al.</i> (2006); Wang <i>et al.</i> (2001); McClenahan <i>et al.</i> (2011); Baylis <i>et al.</i> (2011)
Parvovirus Suíno	Characterization... (2010); Eloit (1997)	Hallauer <i>et al.</i> (1971); Hallauer <i>et al.</i> (1972); Molitor <i>et al.</i> (1991); Fikrig e Tattersall (1992); Soares <i>et al.</i> (1999); Characterization... (2010)	
Vírus da Leucose Enzoótica Bovina	Wessman e Levings (1998); Eloit (1997)		

#### 2.4.1 Vírus da Diarréia Bovina a Vírus

O vírus da Diarréia Bovina a Vírus (BVDV) é um vírus do gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*, esférico, pequeno (40-60nm), que contém um nucleocapsídeo icosaédrico revestido externamente por um envelope derivado das membranas da célula do

hospedeiro. Apresenta um genoma constituído por uma molécula de RNA de cadeia simples, polaridade positiva e com aproximadamente 12,5 Kb. O genoma do BVDV contém uma única janela aberta para leitura (ORF), flanqueado por duas regiões terminais não traduzidas (5' e 3' UTR). Os genes que codificam as proteínas

estruturais se localizam na extremidade 5' do genoma, e os que codificam as proteínas não estruturais, na extremidade 3' (Collett *et al.*, 1988; Francky *et al.*, 1991; Wengler *et al.*, 1995; Flores, 2007).

Os isolados do BVDV são usualmente tipificados baseados na comparação de sequências da região 5'UTR, Npro e região E2 (Vilcek *et al.*, 2005). A região 5'UTR tem sido muito utilizada em genotipagem dos isolados desse vírus, por ser uma região altamente conservada entre os pestivirus, o que facilita a amplificação por PCR (Flores, 2007). Cortez *et al.* (2006) caracterizaram geneticamente 19 isolados brasileiros através da análise da região 5'UTR.

Segundo Ridpath *et al.* (1996), as variações na sequência de nucleotídeos na região 5'UTR do genoma permitiram a classificação do BVDV em dois genótipos BVDV-1 e BVDV-2. Cada um desses genótipos pode possuir dois biótipos: citopáticos e não-citopáticos, de acordo com seu efeito lítico em células infectadas (Donis, 1995). Recentemente, através de análises filogenéticas, foi identificado um novo tipo de BVDV, denominado como pestivirus atípico de bovino, isolado de um lote de soro fetal proveniente do Brasil (Schirmeier *et al.*, 2004). Este isolado tem sido proposto a ser classificado como BVDV-3 (Liu *et al.*, 2009).

O BVDV é considerado um vírus ubíquo entre bovinos e pode produzir nesses animais uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde infecções subclínicas a doenças fatais (Baker, 1995). Esse vírus pode ainda infectar de forma aguda ou persistente células de bovino ou outras linhagens celulares expostas a matérias primas de origem animal, como o soro bovino (Levings e Wessman, 1991).

O biotipo normalmente encontrado do BVDV contaminando soro fetal bovino é o não-citopático, sendo incapaz de produzir alterações detectáveis nas células infectadas. O soro fetal bovino pode conter também anticorpos contra o BVDV que podem interferir no isolamento desse vírus em tecidos de bovinos infectados ou ainda

levar a resultados falso-positivos em testes sorológicos ou imunohistoquímicos (Bolin *et al.*, 1991).

Em geral, as contaminações celulares ocasionadas pelo BVDV são difíceis de serem detectadas ou ainda podem passar despercebidas por tempo indeterminado (Bolin *et al.*, 1991). Estas podem causar pequenas mudanças na taxa de crescimento celular e ainda interferir no crescimento de outros vírus, mas considerando que o vírus é não-citopático, mudanças macro e microscópicas não serão detectadas (Levings e Wessman, 1991; Cobo *et al.*, 2005).

#### 2.4.2 Micoplasmas

O termo micoplasma é amplamente utilizado, mas seria apenas a designação genérica do gênero *Mycoplasma*. Micoplasma foi derivado das palavras gregas, mykes (fungo / filamentos) e plasma (forma) (Timenetski, 2008).

Os micoplasmas são microrganismos de 300 a 800 nm de diâmetro, menores que as bactérias, podem ser observados sob as formas: filamentosa e meningocócica (McGarrity, 1982). Pertencentes à classe *Mollicutes*, família *Mycoplasmataceae*, os microrganismos do gênero *Mycoplasma* ssp. não apresentam parede celular, característica essa responsável por distingui-los das bactérias (Tully, 1992). Devido ao seu pequeno tamanho e flexibilidade, os micoplasmas podem passar através de filtros de 450 e 220 nm comumente utilizados em cultivos celulares (Hay *et al.*, 1989).

Cerca de 20 espécies já foram isoladas em culturas celulares, como o *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma salivarium* e *Acholeplasma laidawii*, os quais são frequentemente detectados. Por outro lado, espécies como *Ureaplasma urealyticum*, *M. pneumoniae* e *M. Pirum* raramente estão presentes (Boolske *et al.*, 1990; Tang *et al.*, 2000).

Os micoplasmas possuem um pequeno genoma circular de fita dupla, que varia de 0,58 a 2,20 Mb, apresentando opções metabólicas limitadas para sua reprodução e sobrevivência, dependendo dos nutrientes dos hospedeiros naturais ou do ambiente em que vivem (Maniloff, 1996).

Observações de diversas interações estabelecidas entre os micoplasmas e as células do sistema imune, seus efeitos imunomoduladores e a descoberta de sistemas genéticos permitiram inferir que os micoplasmas mudam rapidamente sua composição antigênica de superfície. Eles ainda possuem uma capacidade impressionante de manter uma arquitetura de superfície dinâmica, que é antigenicamente e funcionalmente versátil, contribuindo para a capacidade desse agente se adaptar a uma grande variedade de habitats e causar doenças, muitas das vezes de natureza crônica (Rottem, 2003).

Os efeitos celulares ocasionados pelos micoplasmas são mais insidiosos do que os produzidos por bactérias, fungos e leveduras e podem permanecer despercebidos microscopicamente, causando redução da taxa de crescimento, mudanças morfológicas na composição da membrana, aberrações cromossômicas, indução ou supressão de citocinas e alterações no metabolismo de aminoácidos e ácidos nucléicos (McGarrity *et al.*, 1992).

### 2.4.3 Circovirus Suíno tipo 1

O Circovirus Suíno (PCV) foi inicialmente descrito como contaminante não citopático persistente da linhagem celular de rim de suíno (PK15). Esse contaminante é hoje conhecido como Circovirus Suíno tipo 1 (PCV1) (Tischer *et al.*, 1974; Allan *et al.*, 1998).

O PCV1 pertencente à família *Circoviridae*, gênero *Circovirus*, juntamente com os vírus da doença das penas e bicos dos psitacídeos (BFDV), circovírus dos pombos (PiCV), circovírus dos gansos (GoCV) e circovírus do canário (CaCV). O PCV é considerado um dos menores vírus infectantes de vertebrados, possui vírions

de 17 nm de diâmetro, icosaédrico, não-envelopado e um genoma de DNA de fita simples circular, com aproximadamente 1,7 kb. Existem dois tipos de PCV: o PCV1 que não causa sintomatologia clínica em suínos e o PCV2, associado à síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos (Allan *et al.*, 1995).

Os genomas desses vírus são semelhantes na sua organização e apresentam 76% de homologia. Onze janelas abertas de leitura (ORFs) no genoma dos PCV já foram determinadas, mas apenas três delas codificam proteínas já identificadas: ORF 1, ORF 2 e ORF 3. A ORF 1 codifica uma proteína, a Rep, essencial para replicação do DNA viral, enquanto a ORF 2 ou gene *Cap* codifica a proteína do capsídeo. A ORF 3 codifica uma proteína viral não essencial para replicação, mas com papel importante na indução de apoptose. A região intergênica contém a origem da replicação (Tischer *et al.*, 1982; Flores, 2007).

A ORF 2 é considerada uma região espécie-específica para determinação do PCV (Morozov *et al.*, 1998). Três genogrupos do PCV2 foram identificados na Suécia com base nas sequências gênicas da ORF2 (Timmusk *et al.*, 2008). No Brasil, a maioria dos trabalhos estabelece o estudo filogenético do PCV2 envolvendo sequências da ORF2 (Nascimento, 2009).

A replicação dos PCV acontece na fase S do ciclo celular e necessita de várias proteínas da célula hospedeira. Essa ocorre no núcleo das células e envolve a síntese de uma molécula de fita dupla que é denominada de replicativo intermediário (RF). A RF é considerada um genoma codificado por dupla polaridade (positivo para o DNA viral e negativo para o DNA complementar). Após a síntese dessa molécula, o genoma é replicado pelo mecanismo do círculo rolante (Flores, 2007).

O PCV1 tem sido detectado como contaminante em cultivos celulares, principalmente pelo fato de conseguir replicar em uma variedade de células primárias e de linhagem suína e, geralmente

não produzir citopatologia evidente (Flores, 2007). Embora o PCV1 não seja patogênico para suínos (Meehan *et al.*, 1998), a presença deste vírus em produto acabado, como vacina, é inaceitável (Quintana *et al.*, 2006).

#### 2.4.4. Parvovirus Suíno

O Parvovirus Suíno (PPV) é um vírus icosaédrico, desprovido de envelope, responsável por causar falhas reprodutivas em suínos. Outra característica presente deste vírus é a capacidade de aglutinar eritrócitos de determinadas espécies (Flores, 2007).

Pertencente ao gênero *Parvovirus*, família *Parvoviridae*, o PPV, assim como todos os outros membros dessa família, apresenta um genoma de DNA de fita simples linear de 5 kb, caracterizado pela presença de estruturas na forma de grampo nas regiões terminais (Tattersall, 2006).

O genoma apresenta duas grandes ORFs que codificam três proteínas do capsídeo (VP1, VP2, VP3) e uma proteína não estrutural (NS1) que através do processamento alternativo “*splicing*” codifica as proteínas NS2 e NS3 (Figura 1). A VP1 e a VP2 são resultantes do “*splicing*” de um mesmo RNA mensageiro. A VP3 é gerada após clivagem proteolítica da VP2 (Ränz *et al.*, 1989; Bergeron *et al.*, 1993).

Os genes que codificam a VP2 têm sido utilizados para detecção de PPV por serem pouco conservados entre os parvovírus, mas capazes de detectá-lo seletivamente (Molitor *et al.*, 1991). Trabalhos como os realizados por Zimmermann *et al.* (2006) indicam que as sequências presentes nos genes da VP1/VP2 são cruciais para determinação de análises filogenéticas de isolados do PPV.

Similar aos outros parvovírus, a replicação do PPV acontece com a duplicação da fita simples de DNA, que serve como molde para a progênie do DNA de fita simples e para os transcritos de RNA (Molitor *et al.*, 1984).

Alguns fatores como a exigência de um receptor de superfície específico limitam a replicação de um vírus em uma célula infectada. Entretanto, a replicação do PPV não pode ser limitada à superfície celular, uma vez que este vírus é internalizado em células permissivas e não permissivas como já demonstrado por citometria de fluxo (Ridpath e Mengeling, 1988).

Oraveerakul *et al.* (1992) demonstraram a permissibilidade do PPV por imunofluorescência em células de origem suína, bovina, felina, humana, de macaco e hamster, entretanto, não conseguiram demonstrar em células de canino (MDCK), denominando-as de não permissivas. Esses autores sugerem que existem restrições na replicação do PPV em células não permissivas e elas estão associadas à replicação do DNA viral, transcrição do RNA e expressão do antígeno viral, como a ausência de produção de proteínas não estruturais verificadas na replicação do PPV nessas células.

O PPV causa efeito citopático em cultivos primários de rim de suíno e em linhagens celulares de origem suína: ST, PK15 e SK6, caracterizado por arredondamento celular e picnose (Flores, 2007). Este vírus pode ainda estabelecer infecção latente em seus hospedeiros e também causar infecção latente em linhagens celulares contínuas. Devido ao seu pequeno tamanho e a alta estabilidade, os parvovírus são difíceis de serem eliminados em produtos biológicos derivados de culturas celulares contaminadas. Muitas precauções devem ser tomadas a fim de excluir tais agentes em culturas celulares e em reagentes utilizados para mantê-las, como soros e tripsinas (Hallauer *et al.*, 1971; Fikrig e Tattersall, 1992).

#### 2.4.5 Vírus da Leucose Enzootica Bovina

O vírus da Leucose Enzootica Bovina (BLV) é um retrovírus pertencente ao gênero *Deltaretrovirus*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* (Virus, 2012). Este retrovírus é o causador da Leucose Enzootica Bovina, doença esta disseminada nos rebanhos bovinos de todo mundo

(Johnson e Kaneene, 1992). Em cultura de leucócitos, a partícula viral mede de 90-120 nm de diâmetro, constituída por um capsídeo icosaédrico, envelope lipoglicoproteico e um genoma contendo duas moléculas idênticas de RNA de fita simples de polaridade positiva (Murphy *et al.*, 1999).

O genoma viral contém os genes *gag*, *pol* e *env* que codificam proteínas estruturais necessárias para a síntese da partícula viral e ainda uma região chamada de X, localizada entre os genes *env* e a região 3' LTR e que contém pelo menos quatro genes, entre eles os genes Tax e Rex envolvidos, respectivamente, na regulação transcricional e pós-transcricional (Sagata *et al.*, 1984; Dube *et al.*, 1997; Kerkhofs *et al.*, 1998).

O gene *env* codifica proteínas com papel crucial no ciclo de vida do virion. As proteínas codificadas por esse gene estão relacionadas ao tropismo celular e são alvos para anticorpos neutralizantes (Mamoun *et al.*, 1990). As sequências do gene *env* apresentam uma baixa divergência, indicando um alto grau de conservação entre diferentes cepas geográficas deste vírus (Licursi *et al.*, 2003; Camargos *et al.*, 2006).

A replicação dos retrovírus pode ser dividida em duas fases. A primeira envolve, após a penetração e desnudamento do vírus, a síntese de uma cópia de DNA (provírus) a partir do genoma de RNA. A segunda fase envolve a síntese e processamento de RNAm e síntese das proteínas virais. A morfogênese se inicia pelo encapsidamento do genoma, juntamente com as enzimas virais, por precursores das proteínas estruturais e é completada pelo brotamento do nucleocapsídeo na membrana plasmática (Flores, 2007).

Estudos recentes sobre a estrutura do RNA viral *in vitro* e *in vivo* e estudos dos fragmentos do RNA e dos complexos RNA-proteína estão ajudando a desvendar os mecanismos de encapsidamento do genoma e fornecendo os primeiros vislumbres dos estágios iniciais da

montagem dos retrovírus (D'Souza e Summers, 2005).

O BLV provoca a formação de sincícios em cultivo primário de baço, pulmão bovino e células embrionárias diplóides de humanos. Entretanto, evidências experimentais, como hibridização *in situ*, citometria de fluxo, RT-PCR, favorecem um modelo postulando que o BLV é latente em diversas células (Gillet *et al.*, 2007; Flores, 2007). O BLV pode infectar *in vitro* células de origem humana, símia, bovina, canina, caprina, ovina e de morcego (Graves e Ferrer, 1976). Células de macrófago/monócito provenientes de espécies distintas podem ser infectadas *in vitro* pelo BLV (Doménech *et al.*, 2000).

Este vírus é ainda descrito pela literatura e por órgãos regulamentadores como o FDA como sendo um possível contaminante de soro bovino, sendo a sua pesquisa recomendada nestes materiais (Castle e Robertson, 1998; Merten, 2002; Characterization..., 2010).

## 2.5 Técnicas utilizadas para detecção de contaminantes celulares

A existência de procedimentos de assepsia no local de trabalho das células não é suficiente para evitar que contaminações celulares ocorram, sendo essencial o monitoramento das culturas celulares com a realização de testes para verificação de contaminantes (Langdon, 2004). As contaminações biológicas suspeitas, mas não evidentes macroscopicamente, requerem testes de controle de qualidade nas culturas celulares e nos insumos utilizados (Freshney, 2002).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para detectar as contaminações biológicas como Isolamento em Meio de Cultura, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Técnicas de Coloração Fluorescente do DNA, Microscopia Fluorescente e Ensaio de Detecção de Níveis de Anticorpos frente a agentes específicos (Freshney, 2002; Merten, 2002).



As técnicas utilizadas apresentam vantagens e desvantagens que permitem a escolha do método mais adequado para determinados fins. Contaminações celulares ocasionadas por vírus, micoplasmas e bactérias são identificadas utilizando ensaios de detecção de níveis de anticorpos produzidos em camundongos (MAP) e ratos (RAP) (Bootz *et al.*, 2003). Esses testes são realizados pela inoculação da célula a ser avaliada em animais livres de microrganismos, usando várias vias de inoculação (oral, intranasal, intraperitoneal e intracranial) e depois de um determinado tempo são examinados os níveis de anticorpos séricos (Schiff, 2005).

As maiores desvantagens dos ensaios MAP e RAP são o uso de animais vivos e o extenso tempo requerido de teste, de quatro a seis semanas (Bauer *et al.*, 2004). Os princípios estabelecidos por Russel e Burch (1959) denominados 3R (*refine, reduce and replace*) que consistem em refinar, reduzir e substituir o uso de animais em experimentos continuam a servir como base ética para experimentação animal e promovem, ainda, o desenvolvimento de métodos alternativos como a PCR (Bootz *et al.*, 2003; Liebsch *et al.*, 2011).

O isolamento em meio de cultura, classificação por testes bioquímicos, métodos de corantes fluorescentes de DNA como o Hoescht 33258, são considerados métodos clássicos para detecção de micoplasmas em cultivos celulares (Langdon, 2004). Entretanto, o tempo do teste é elevado com a utilização dessas metodologias, limitando significativamente o âmbito de aplicação em situações que requerem tomadas de decisão, principalmente durante processos de rotina (Volkhov *et al.*, 2011). Além disso, muitos micoplasmas não são facilmente cultivados, sendo detectados por PCR e ELISA (Mirjalili *et al.*, 2005).

### **2.5.1 Órgãos regulamentadores - Técnicas recomendadas para detecção de contaminantes celulares**

*The International Conference on Harmonization* (ICH) reúne membros de

entidades regulamentadoras e indústrias farmacêuticas da Europa, Estados Unidos e Japão a fim de discutir aspectos técnicos e científicos de registro de medicamentos. A ICH elaborou um documento que preconiza a realização de testes para avaliação da segurança viral de produtos biotecnológicos derivados de linhagens de células de origem humana e animal, sendo esse documento denominado Q5A (Viral..., 2006).

Testes de Inoculação *in vitro*, *in vivo*, Ensaio de Produção de Anticorpos em camundongos, ratos e hamsters (MAP, RAT, HAP) e a PCR são recomendados no Q5A para avaliar a presença de contaminantes celulares. Para detecção de retrovírus como contaminante, esse documento recomenda a microscopia eletrônica, ensaios de infectividade em culturas de células sensíveis e técnicas de PCR baseadas na transcrição reversa (Viral..., 2006).

O órgão regulamentador dos EUA, *Food and Drug Administration* (FDA), publicou um documento que complementa o Q5A, direcionado aos fabricantes de vacinas virais, que consiste na caracterização e qualificação dos substratos celulares, sementes virais e outros materiais biológicos utilizados para a produção de vacinas virais para uso humano. As técnicas recomendadas neste documento são semelhantes às propostas no Q5A. O documento, ainda, indica a PCR como uma ferramenta eficaz para identificar contaminantes virais que não podem ser facilmente cultivados em culturas (Characterization..., 2010).

O Código de Regulamentos Federais (CFR) da Secretaria do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) também preconiza a realização de ensaio com anticorpo marcado com uma molécula fluorescente para a verificação de contaminantes virais ou vírus estranhos em culturas celulares utilizadas na produção de produtos biológicos. Para detecção de micoplasmas, são recomendados testes em caldos ou ágar de infusão de coração (Code..., 2012).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) apresenta uma série de testes que podem ser utilizados na detecção de micoplasmas e vírus como contaminantes celulares em materiais biológicos. A PCR é um exemplo de metodologia recomendada pela OIE (Tests..., 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) descreve a PCR como uma metodologia emergente e recomendada pela Farmacopéia Européia para detecção de micoplasma como contaminante celular. Esse órgão ainda relata a PCR como sendo uma ferramenta apta a detectar agentes que não causam efeito citopático ou que infectam as células de forma latente (Study..., 2007).

No Brasil, a Instrução Normativa n.07 de 10 de março de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda a utilização de metodologias previstas em farmacopéias ou referências nacionais ou internacionais aceitas pelo MAPA para detecção de *Mycoplasma* ssp. e outros agentes estranhos em vacinas e diluentes para uso na avicultura. Essa normativa, propõe, por exemplo, para a detecção de agentes estranhos, a realização de pelo menos um dos seguintes testes: inoculação em culturas celulares, ovos embrionários ou em galinhas conforme técnica e procedimento estabelecido em referências nacionais ou internacionais (Brasil, 2006).

A Resolução RDC N 55, de 16 de dezembro de 2010, elaborada pela Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa) objetiva estabelecer os requisitos mínimos para o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos no país visando garantir a qualidade, segurança e eficácia. A detecção de agentes estranhos em vacina é recomendada neste documento, entretanto os métodos que devem ser utilizados para tal fim não são mencionados. Para o controle de qualidade de hemoderivados, como o plasma, a PCR é recomendada a ser utilizada, sendo uma ferramenta útil na detecção de possíveis agentes virais presentes (Agência..., 2010).

## 2.5.2 A PCR na detecção de contaminantes celulares

A aplicação de métodos de PCR tem atraído muita atenção na detecção de contaminantes celulares, por causa de sua extrema sensibilidade e especificidade, por ser ainda uma técnica rápida e apresentar robustez (Rawadi e Dussurget, 1995; Bauer *et al.*, 2004; Zhi *et al.*, 2010).

De acordo com Volokhov *et al.* (2011), embora a PCR seja uma metodologia existente a décadas, essa técnica somente teve sua aplicação no controle de qualidade de produtos biológicos, em especial na detecção de micoplasma, recentemente. Esse evento pode ser atribuído a sua simplicidade, ao curto tempo de resposta e a um limite de detecção comparável ou superior que a PCR apresenta em relação aos métodos de cultura.

Muitos agentes infecciosos são detectados por essa metodologia pelo fato de não serem facilmente cultiváveis (Merten, 2002).

Ayral *et al.* (2006), desenvolveram um painel de iniciadores e controles positivos de plasmídeos de DNA para serem utilizados por PCR em linhagens celulares, tecidos ou soro animal. Os autores padronizaram, por exemplo, uma PCR para *Mycoplasma* ssp. tendo como alvo a região 16s-23s do RNA ribossômico deste microorganismo e um método simples e rápido de extração de DNA em amostras de célula.

Timenetsky *et al.* (2006) observaram, através da PCR, a ocorrência de 30,9% de *Mollicutes* em um total de 301 culturas celulares avaliadas. Camargos *et al.* (2008) também estabeleceram a ocorrência de *Mycoplasma* ssp. (*Mollicutes*) em cultivos celulares através da implementação de um protocolo rápido de extração de DNA e pelo uso de PCR. Uma PCR para avaliar a eficiência do DNA extraído tendo como alvo o gene da beta-actina também foi utilizada nesse estudo.

Brânzeu *et al.* (2008) utilizaram também a PCR para detecção de *Mycoplasma* ssp. em um total de 34 culturas celulares e verificaram em 11,65% das culturas celulares, a presença do DNA deste agente. Cristo *et al.* (2009) realizaram uma triagem para *Mycoplasma* ssp. através de PCR em 100 amostras provenientes de três linhagens celulares e verificaram que todas as amostras estavam contaminadas. A PCR utilizada por esses autores foi capaz de monitorar a contaminação, uma vez que as amostras eram tratadas com antibióticos e avaliadas por essa técnica.

Peredeltchouk *et al.* (2011) padronizaram uma técnica de RT-PCR para detecção de micoplasmas (*Mollicutes*) a fim de aumentar o limite de detecção em relação a uma PCR descrita por Kuppeveld *et al.* (1992) e conseguiram aumentar o limite de detecção, entretanto, alguns inconvenientes ocorreram, como o aparecimento de bandas espúrias.

A PCR foi utilizada também para detecção do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV), Circovírus Suíno tipo 1 (PCV1), Parvovirus Suíno (PPV) como contaminantes em culturas celulares, vacina e soro fetal bovino (Bolin *et al.*, 1994; Audet *et al.*, 2000; Vilcek *et al.*, 2001; Quintana *et al.*, 2006; Baylis *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2012).

Bolin *et al.* (1994) avaliaram a presença do genoma de BVDV em amostras de células provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) e verificaram a presença do genoma do vírus em diferentes espécies de células. Audet *et al.* (2000) utilizaram uma nested transcriptase reversa seguida de PCR (RT-PCR) que foi capaz de detectar contaminações ocasionadas por *Pestivirus* em amostras de vacinas e verificar a permissibilidade da cepa NADL do BVDV em diferentes espécies de linhagens celulares utilizadas na produção destes produtos biológicos. *Pestivirus* foram identificados como contaminantes em soro fetal bovino e em linhagens celulares utilizando uma RT-PCR que contém iniciadores que amplificam a região 5'UTR (Vilcek, 2001).

Quintana *et al.* (2006) detectaram a presença do genoma de PCV1 por PCR em duas das dezoito vacinas de suínos avaliadas.

Para investigar a presença do genoma do PCV1 em linhagens celulares utilizadas para a produção de vacinas, Ma *et al.* (2011) utilizaram uma nested-PCR que apresenta como alvo a região *cap-rep* do genoma do PCV1. A nested-PCR utilizada permitiu a detecção de até 10 cópias do PCV1 e, a detecção do genoma desse agente em uma linhagem celular de origem bovina.

Baylis *et al.* (2011) utilizaram várias metodologias para detecção do PCV1 como agente estranho presente em vacinas, incluindo a PCR em tempo real que foi capaz de quantificar os níveis de DNA de PCV1 presentes nos lotes das vacinas contaminadas e a PCR convencional seguida do sequenciamento dos produtos amplificados que permitiu a confirmação do genoma deste agente.

Kumar *et al.* (2012) desenvolveram uma PCR convencional a fim de detectar o PCV1 em vacinas e insumos necessários para a sua produção do *Bharat Biotech International Limited*, localizado na Índia. Não foi detectado o DNA do PCV1 em nenhuma vacina ou insumo avaliado.

Para a pesquisa de Parvovirus Suíno como contaminante celular, Molitor (1991) padronizou uma PCR que amplifica o gene da VP2, otimizando o número de ciclos, temperatura de anelamento e a concentração de magnésio. A especificidade do produto amplificado nessa PCR foi confirmada pela restrição enzimática com *EcoRI*. Soares *et al.* (1999) desenvolveram uma PCR e uma nested-PCR para detecção do PPV em linhagens celulares infectadas e amostras clínicas.

A PCR tem sido também uma alternativa aos métodos que requerem a utilização de animais, como os tradicionais ensaios de produção de anticorpos em camundongos (MAP) (Ayrál *et al.*, 2006).

Bauer *et al.* (2004) compararam a PCR com o MAP na detecção de onze diferentes contaminantes virais de linhagens celulares e tumores transplantados e verificaram que a PCR apresentou resultados melhores ou comparáveis com o MAP para todos os agentes testados. O mesmo foi observado por Bootz *et al.* (2003) quando quatorze contaminantes virais foram avaliados pelos dois métodos.

A PCR juntamente com métodos de análise filogenética tem proporcionado a detecção de novos agentes estranhos. Schirrmeier *et al.* (2004) conseguiram identificar um isolado atípico do gênero *Pestivirus*, denominado D32/00\_‘HoBi’, em amostra de soro fetal bovino de origem brasileira. Diferentes regiões do genoma deste isolado foram amplificadas utilizando técnicas de Reação da Transcriptase Reversa seguida de PCR (RT-PCR). Os diferentes produtos amplificados pelas RT-PCR foram clonados, sequenciados e submetidos a análises filogenéticas que revelaram uma distinção clara deste isolado dos outros pestivírus, permitindo assim sua caracterização.

Em 2005, um vírus até então desconhecido, o Parvovirus 4, foi detectado por PCR e confirmado pelo sequenciamento do produto amplificado seguido de análise filogenética em uma amostra de plasma de um usuário de droga injetável positivo para hepatite B (Jones *et al.*, 2005). O novo parvovirus foi detectado também por PCR e confirmado por sequenciamento em preparações comerciais do fator VIII da cascata de coagulação (Szelei *et al.*, 2010).

Kulcsar *et al.* (2010) constataram através da PCR seguida de sequenciamento que o Torque Teno Virus foi considerado recentemente como um novo contaminante em vacinas aviárias na Hungria.

Cada vez mais a PCR e outros métodos rápidos de diagnóstico se tornam aceitos em entidades regulamentadoras para detecção de contaminantes celulares, como micoplasmas (Zhi *et al.*, 2010), proporcionando seu uso como referência a ser seguida por diversas instituições.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local do Experimento**

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Biologia Molecular (LBM) e Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV), ambos pertencentes ao Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais (LANAGRO/MG) e no Laboratório de Cultivo Celular da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

#### **3.2 Amostras**

##### **3.2.1 Controles**

Foram utilizados controles positivos em todas as reações de PCR. A tabela 3 descreve os controles positivos utilizados neste trabalho.

Tabela 3 - Informações sobre os controles positivos utilizados

Controle	Descrição	Origem
PCV1	DNA isolado de um sobrenadante de cultivo de linhagens contínuas de células de rim de suíno (PK15), previamente testadas para a presença do PCV pelas técnicas de Imunofluorescência Direta e Imunoperoxidase	Escola de Veterinária da UFMG
BVDV	BVDV não citopático tipo II, cepa W2	Universidade Federal de Santa Maria.
PPV	Cepa de Parvovírus Suíno NADL-2 previamente titulada por hemaglutinação	Escola de Veterinária da UFMG
BLV	DNA isolado da linhagem celular de rim de cordeiro (FLK), previamente sequenciado com a nested-PCR recomendada pela OIE	LANAGRO-MG
Micoplasma ( <i>Mollicutes</i> )	DNA do <i>Mycoplasma bovis</i>	Instituto Biológico (SP)
Beta-actina	DNA de linhagens celulares de origem bovina (MDBK), suína (PK15) e de símio (VERO)	LANAGRO-MG
GAPDH	DNA de linhagens celulares de origem bovina (MDBK), suína (PK15) e de símio (VERO)	LANAGRO-MG

### 3.2.2 Linhagens Celulares

Foram analisadas 88 amostras de cultura celular na forma de suspensão contidas em ampolas de congelamento (concentração aproximada de  $10^6$  células/mL) pertencentes a 32 linhagens celulares provenientes de oito laboratórios, envolvendo cinco laboratórios de redes oficiais codificados de RO1 a RO5 e três laboratórios de

instituições de pesquisa e ensino codificados de IPE1 a IPE3. Em alguns casos, uma mesma linhagem celular foi recebida de mais de um laboratório e/ou testada em passagens diferentes. A tabela 4 apresenta as espécies, tipo de linhagem celular, tecido de origem e número de linhagens analisadas por laboratório para a pesquisa de contaminantes.

Tabela 4 - Espécie, tipo de linhagem celular, tecido de origem e número de linhagens por laboratório analisadas para a pesquisa de contaminantes

Origem da Linhagem Celular	Linhagem celular	Tecido (origem)	Número de amostras testadas por laboratório								Total	
			RO1	RO2	RO3	RO4	RO5	IPE1	IPE2	IPE3		
Bovino	MDBK	Rim	04	01	02	03			01		02	13
	EBTr	Traquéia									01	01
	BT	Turbinado									01	01
Suíno	PK15	Rim	04	01		02					04	11
	SK6	Rim	04	01							01	06
	ST	Testículo	01		01						01	03
	LLCPKI	Rim	01									01
	IBRS2	Rim									01	01
Macaco	VERO	Rim	02	03	01	01	01			01	02	11
	MA104	Rim	01								01	03
	BGM	Rim									01	01
	BSC 40	Rim									01	01
	FRHK	Rim					01					01
Hamster	BHK21	Rim	03			02					01	05
	CHO	Ovário									01	01
Rato	McCoy	Fibroblasto									01	01
	N2A	Cérebro									01	01
Camundongo	L929	Fibroblasto									01	01
	RAW	Linfócito									01	01
Coelho	RK13	Rim	02								01	03
Felino	CRFK	Rim	03								01	04
	CC81	Embrionário									01	01
	G355	Astrócito									01	01
Cordeiro	FLK	Rim								03	03	
Canino	MDCK	Rim								02	02	
Humano	Hela	Colo do útero									01	01
	Hep G2	Fígado						01				01
	INT 407	Intestino									01	01
Inseto	TN5B	Ovário									02	02
	SF21	Larva									01	01
	C6/36	Larva									01	01
Equino	ED	Derme								02	02	
	Total		25	06	04	08	03	02	01	39	88	

### 3.2.3 Insumos: soros bovinos e tripsinas

Foram analisadas amostras de soros bovinos e tripsinas enviadas pelos laboratórios RO1, RO2, RO3, RO5 e IPE3. Dez amostras de lotes diferentes de

tripsinas (apresentadas na forma de pó) provenientes de 6 fabricantes e 13 amostras de lotes diferentes de soro bovino provenientes de 11 fabricantes foram testadas (Tabela 5).

Tabela 5 - Identificação dos laboratórios e insumos enviados para pesquisa de contaminantes celulares por fabricante

Laboratório	Tripsina	Fabricante ou marca (F)	Soro Bovi no	Fabricante ou marca (M)
RO1	T1	F1	SB1	M1
	T2	F2	SB2	M2
	T3	F3	SB3	M3
			SB4	M4
			SB5	M4
			SB6	M5
			SB7	M6
RO2	T4	F1	SB8	M7
	T5	F2	SB9	M8
RO3	T6	F4	SB10	M9
RO5	T7	F5	SB11	M10
IPE3	T8	F1	SB12	M8
	T9	F6	SB13	M11
	T10	F6		
Total	10	6	13	11

### 3.3 Padronização dos Métodos

#### 3.3.1 Extração do Material Genético

##### 3.3.1.1 Extração de RNA

A extração de RNA de diferentes amostras (linhagens celulares, tripsina e soro bovino) foi realizada utilizando o método de Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, EUA). Os diferentes tipos de amostras foram extraídos em dias separados e em cada extração realizada foi adicionado, no mínimo, um controle negativo da extração, contendo 375 µL de água livre de nucleases. As quantidades das amostras submetidas à extração foram: 375 µL de suspensão celular; 375 µL de soro bovino e 0,05 g de tripsina diluída em 375 µL de água livre de nucleases. Foi adicionado 1 mL de Trizol<sup>®</sup> nas amostras e em seguida realizada uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio, os tubos foram então agitados vigorosamente e submetidos

a uma centrifugação de 12.000 g durante 15 min à temperatura de 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa superior obtida foi transferida para outro tubo e o RNA foi precipitado utilizando 500 µL de álcool isopropílico e submetido a uma nova centrifugação de 12.000 g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado invertendo cuidadosamente o tubo e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75%, homogeneizado e centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e os microtubos foram invertidos em papel absorvente por alguns minutos para secagem completa do etanol. O precipitado foi ressuspenso em 20 µL de água livre de nucleases (água DEPC) e o produto armazenado a -70°C, até a sua utilização.

##### 3.3.1.2 Extração de DNA

Foram utilizados dois métodos de extração de DNA: i) o método de Fenol-Clorofórmio

(Sambrook *et al.*, 2001) destinado a extração de DNA das amostras de soro bovino e tripsina e ii) modificação do protocolo proposto por Fonseca Jr *et al.* (2010) para a extração de DNA das linhagens celulares.

- Extração de DNA– amostras de soro bovino e tripsina

Foi utilizada uma quantidade de 500 µL de soro bovino e 0,05g de tripsina diluída em 500 µL de água livre de nucleases conforme realizado por Teixeira *et al.* (2011) para a extração de DNA utilizando o método de Fenol-Clorofórmio. As amostras de soro bovino foram extraídas em dias diferentes das amostras de tripsina e, em cada extração foi acrescentado, no mínimo um tubo contendo 500 µL de água livre de nucleases para o controle de extração. Adicionou-se 20 µL de Proteinase K (10 mg/mL) às amostras e os tubos foram incubados em banho-seco a 55°C durante 1 h. Em seguida, adicionou-se 200 µL de fenol saturado pH 8. A mistura foi homogeneizada por inversão e imediatamente centrifugada a 434 g durante 5 min à temperatura ambiente. A fase aquosa superior obtida foi transferida para outro tubo, com auxílio de micropipeta e adicionou-se 200 µL de clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 24:1. A mistura foi homogeneizada e centrifugada novamente a 434 g por 5 minutos à temperatura ambiente. Coletou-se a fase aquosa superior e transferiu-se para um novo tubo. Foram adicionados 2x o volume da fase aquosa de etanol 95% e 1x o volume da fase aquosa de acetato de amônio. A mistura foi homogeneizada e incubada a -80°C por 1 h. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 18.327 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente por inversão e em seguida, foi adicionado 500 µL de etanol 70% para lavagem do DNA. Centrifugou-se novamente 18.327 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram invertidos em papel absorvente para secagem completa do etanol. O precipitado foi ressuscitado em 50 µL de em tampão TE (10mM Tris HCl 1mM EDTA , pH 8) e o produto armazenado a -20°C, até a sua utilização.

- Extração de DNA- linhagens celulares

O DNA das células foi extraído utilizando uma quantidade de 20 µL de proteinase K (10 mg/mL) em 200 µL de suspensão celular criopreservada. Foram acrescentados tubos contendo 200 µL de tampão TE (10mM Tris HCl 1mM EDTA, pH 8) para o controle de extração. As amostras foram incubadas em banho-seco a 55°C durante 1 h. Em seguida, centrifugadas a 16.000 g por 1h a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado em tampão TE (10mM Tris HCl 1mM EDTA , pH 8) e incubado a 90°C durante 30 min. O produto foi armazenado a -20°C, até a sua utilização.

### 3.3.1.3 Dosagem de RNA e DNA

Utilizou-se o instrumento NanoVue® (GE Healthcare, EUA) para estimar a quantidade e a qualidade do material genético extraído por amostra.

### 3.3.2 Reação em Cadeia pela Polimerase - PCR

#### 3.3.2.1 PCR para avaliação da eficiência das extrações

Para avaliar a eficiência das extrações dos materiais genéticos de todas as amostras extraídas, foram utilizadas as seguintes PCR: a PCR em tempo real para o gene da beta-actina (Bielanski *et al.*, 2009) e a PCR convencional para o gene GAPDH desenvolvida no presente trabalho, utilizada quando não houve detecção do gene da beta-actina. O DNA das amostras extraído foi diretamente submetido a essas PCR, enquanto que o RNA necessitou ser transcrito em DNA complementar (cDNA) para ser então submetido às PCR. Para isso, utilizou-se o kit *Reverse Transcription System* (Promega, EUA) conforme protocolo estabelecido pelo fabricante.

#### 3.3.2.2 PCR para detecção de contaminantes celulares

Foram realizadas PCR para detecção do material genético de micoplasma



(*Mollicutes*), PCV1, PPV e BLV a partir do DNA extraído. O RNA foi utilizado como produto para amplificação do BVDV utilizando uma Transcrição Reversa seguida de PCR (RT-PCR) convencional e uma RT-PCR em tempo real.

### 3.3.2.3 Iniciadores

Os pares de iniciadores utilizados para detecção dos genes de GAPDH, micoplasma (*Mollicutes*), BLV e BVDV foram escolhidos recorrendo-se a literatura. Para detecção dos genes GAPDH, do PPV e do PCV1 os iniciadores foram desenhados neste trabalho. A tabela 6 apresenta as sequências dos iniciadores utilizados, informações do produto amplificado e referências.

- Desenho dos iniciadores para detecção do material genético do GAPDH, PPV e PCV1

A partir de sequências dos genes GAPDH de diferentes espécies, PPV e PCV1 disponíveis no GenBank (NCBI) foi realizado o alinhamento dessas sequências através do programa Bioedit (Hall, 1999). Após a verificação das regiões mais conservadas, utilizou-se o programa Primer3Plus para o desenho dos iniciadores (Untergasser *et al.*, 2007). Uma vez desenhados, os pares de iniciadores foram submetidos a análises *in silico* utilizando o programa OligoAnalyzer 3.1 (IDT, EUA) para verificação de estruturas secundárias e dímeros. Para testar a especificidade *in silico* dos iniciadores foi utilizado o Primer Blast e o Blast (NCBI).

Tabela 6 - Descrição dos iniciadores utilizados, informações dos produtos amplificados e referência

Agentes	Iniciadores	Sequência de iniciadores (5'3')	Região	Tamanho do produto	Referência
Micoplasma ( <i>Mollicutes</i> )	MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	16S	280 pb	Kuppeveld <i>et al.</i> (1994)
	GPO3	GGGAGCAAACAGGATTAGATAC CCT			
PCV1	PCV1 MestF	GGTGGAGGGGGTTACAAAGT	ORF 2 (gene <i>Cap</i> )	283 pb	Presente trabalho
	MestR	CCGAAAGACGGGTATCTTCA			
BLV (PCR externa)	OBLV1A	CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA	Env	440 pb	Manual... (2008)
	OBLV6A	CCAACATATAGCACAGTCTGG GAAGGC			
BLV (PCR interna)	OBLV3	CTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGC	Env	341 pb	Manual... (2008)
	OBLV5	GACAGAGGGAACCCAGTCACTGTTCAACTG			
BVDV (PCR conv.)	P1	CATGCCATAGTAGGAC	5'UTR	283 pb	Ridpath e Bolin (1998)
	P2	CCATGTGCCATGTACAG			
BVDV (qPCR*)	F	TAGCCATGCCCTTAGTAGGAC	5'UTR	93pb	Bhudevi e Weinstock (2001)
	R	GACGACTACCCTGTACTCAGG			
PPV	PPVMestF	GGGAGGGCTTGGTTAGAATC	VP1/VP 2	408 pb	Presente trabalho
	PPVMestR	TTCTAGGTGCTGCTGGTGTG			
PPV	VP2F	CCACAGAAGGAGACCAACAC	VP2	117 pb	Presente trabalho
	VP2R	CTACCTGAGCTGGCCTAATTG			
	Sonda	5Cy5/CAGGAACACTACCAGCAGCAGCTAACA CA/3IAbRQSp			
PPV	NS2F	GGACCAGGCAACAGACATGG	NS2	174 pb	Presente trabalho
	NS2R	GTGTTGTTGGCTCGCTCCAC			
Beta-ctina (qPCR*)	Actin-Taq-F	AACCAGTTCGCCATGGAT	Beta-actina	57 pb	Bielanski <i>et al.</i> (2009)
	Actin-Taq-F	TGCCGGAGCCGTTGT			
	Sonda Actin	56-FAM/TGATATTGCTGCGCTC GTGGTC/3BHQ_1			
GAPDH	709 F	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	GAPDH	709 pb	Presente trabalho
	709 R	CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT			

\* qPCR: PCR em tempo real.

### 3.3.2.3 Especificidade analítica dos iniciadores

Os iniciadores foram testados frente aos controles positivos dos contaminantes em estudo e ainda frente a materiais genéticos

alvos e não alvos conforme mostrado na tabela 7, com o objetivo de avaliar a especificidade analítica dos mesmos. Os DNAs e RNAs de bovinos e suínos foram previamente avaliados para o gene da Beta-ctina.

Tabela 7 - DNA dos agentes utilizados para avaliação da especificidade dos iniciadores

Iniciadores	Material genético
PCV1	DNA de um isolado de PCV2, DNA de bovino e DNA de suíno.
PPV	DNA de bovino e DNA de suíno.
Micoplasma ( <i>Mollicutes</i> )	DNA <i>M. hyopneumoniae</i> , DNA <i>M. mycoides</i> subespécie <i>mycoides small colony</i> (MmSC), DNA de bovino e DNA de suíno
BLV	DNA de bovino e DNA de suíno.
BVDV	RNA cepa NADL citopatogênica, RNA do vírus da Peste Suína Clássica (PSC) cepa Bréscia, RNA bovino e RNA suíno

### 3.3.2.4 Otimização das PCR

As PCR foram padronizadas utilizando os controles positivos previamente descritos. Foram utilizados também controles negativos contendo apenas os reagentes das PCR. Algumas variações nas PCR para GAPDH, PCV1 e PPV, desenvolvidas neste trabalho, foram realizadas visando fornecer uma maior eficiência, sensibilidade e especificidade às PCR.

Variações na temperatura de anelamento (50, 52 e 54°C) e variações no tempo de extensão (30 e 50 s) foram realizadas na

PCR para GAPDH. Nas PCR de PPV e PCV1, foram realizadas variações nas temperaturas de anelamento (54, 55, 56 e 57°C) e na PCR para PCV1 realizou-se variações nas concentrações dos iniciadores (10 e 20 pmoles).

### 3.3.2.5 Condições de Amplificação

As condições de amplificação das PCR utilizadas neste estudo como as constituições das reações, a marca do termociclador utilizado, as condições de ciclagem estão apresentadas na tabela 8. Estas condições foram todas controladas.

Tabela 8- Descrições das reações, termocicladores utilizados e condições dos ciclos das PCR utilizadas

PCR	Reação	Termociclador	Ciclos
Beta-actina Tempo Real	Volume final 20 µL; mistura constituída por 0,25 pmol/µL dos iniciadores Actin direto e reverso e da sonda Actin; mix TaqMan® 1x (Applied Biosystems, EUA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> (Invitrogen, EUA) e água tratada com DEPC estéril qsp 20 µL. Utilizou-se 2 µL do DNA ou cDNA.	Real Time PCR 7500® Fast System (Applied Biosystems, EUA)	50 °C – 2 s 95 °C – 15 min 45X 95 °C – 15 s 60 °C – 60 s
GAPDH Convencional	Volume final de 25 µL de solução contendo 0,38 pmol/µL dos iniciadores GA 709 F e R; 0,20 mM de DNTPs (Promega, EUA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> (Promega, EUA); Tampão Taq 1x Gotaq® Green (Promega, EUA); 0,052 U/µL de Taq Gotaq® DNA polimerase (Promega, EUA) e água tratada com DEPC estéril qsp 20 µL. Foram utilizados 2 µL do DNA ou cDNA na reação.	Px2 Thermal Cyclor (Thermo Electron Corporation, EUA)	95 °C – 4 min 35X 95 °C – 30 s 54 °C – 30 s 72 °C – 50 s 4°C – ∞
RT-PCR BVDV Convencional	Volume final de 20 µL constituído por 1 pmol/µL dos iniciadores P1 e P2; Access Quick master® 1x (Promega, EUA) ); 0,1 U/µL de AMV Reverse Transcriptase (Promega, EUA) e água livre de nucleases q.s.p 20 µL. Na reação foram utilizados 2 µL de RNA.	Bloco Duplo Biocycler (Biosystems, Brasil)	45 °C – 45 min 94 °C – 2 min 35X 94 °C – 30 s 50 °C – 30 s 72 °C – 30 s 72 °C – 5 min
RT-PCR BVDV Tempo Real	Volume final de 20 µL constituído por 1 pmol/µL dos iniciadores direto e reverso; Quantifast Probe® RT-PCR mix 1x (Qiagen, EUA); 0,25 pmol/µL de sonda e 0,25 µL de Fast RT (Qiagen, EUA) e água livre de nucleases q.s.p 20 µL. Na reação foram utilizados 2 µL de RNA.	Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Austrália)	50 °C – 30 min 95 °C – 15 min 45X 94 °C – 15 s 50 °C – 45 s
PCR Micoplasma ( <i>Mollicutes</i> ) Convencional	Volume final de 20 µL de uma mistura constituída por 4 ng/µL dos iniciadores MGSO e GPO3; 0,25 mM de DNTPs (Promega, EUA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> (Promega, EUA); Tampão Taq 1x Gotaq® Green (Promega, EUA); 0,05 U/µL de Taq Gotaq® DNA polimerase (Promega, EUA) e água tratada com DEPC estéril qsp 20 µL. Na reação foram utilizados 2 µL de DNA extraído.	Bloco Duplo Biocycler (Biosystems, Brasil)	95 °C – 10 min 30X 94 °C – 30 s 57 °C – 60 s 72 °C – 60 s 72 °C – 10 min
PCR PCV1 Convencional	Volume final de 25 µL de solução contendo 1,04 pmol/µL dos iniciadores PCV1mest F e R; 0,20 mM de DNTPs (Promega, EUA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> (Promega, EUA); Tampão Taq 1x Gotaq® Green (Promega, EUA); 0,052 U/µL de Taq Gotaq® DNA polimerase (Promega, EUA) e água tratada com DEPC estéril qsp 20 µL. Foram utilizados 2 µL de DNA.	Px2 Thermal Cyclor (Thermo Electron Corporation, EUA)	95 °C – 5 min 40X 95 °C – 25 s 57 °C – 25 s 72 °C – 25s 72 °C – 5 min 4 °C – ∞

continua...

continuação

PCR	Reação	Termociclador	Ciclos
PCR PPV Convencional	Volume final de 25 µL de solução contendo 0,52 pmol/µL dos iniciadores PPVmest F e R; 0,20 mM de DNTPs (Promega, EUA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> (Promega, EUA); Tampão Taq 1x Gotaq <sup>®</sup> Green (Promega, EUA); 0,026 U/µL de Taq Jumpstart (Sigma-Aldrich, EUA) e água tratada com DEPC estéril qsp 20 µL. Foram utilizados 2 µL de DNA.	Bloco Duplo Biocycler (Biosystems, Brasil)	95 °C – 5 min 40X 95 °C – 25 s 57 °C – 25 s 72 °C – 25 s 72 °C – 5 min
PCR PPV NS2	Volume final de 20 µL constituído por 0,5 pmol/µL dos iniciadores NS2 F e R; Access Quick master <sup>®</sup> 1x (Promega, EUA); 0,1 U/µL de AMV Reverse Transcriptase (Promega, EUA) e água livre de nucleases q.s.p 20 µL. Na reação foram utilizados 2 µL de RNA.	Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, EUA)	45 °C – 45 min 94 °C – 2 min 40X 95 °C – 20 s 60 °C – 20 s 72 °C – 35 s
PCR PPV VP2	Volume final 20 µL; Solução prime Time PPV 1x; mix Amplicon <sup>®</sup> 1x (Applied Biosystems, EUA) e água tratada com DEPC estéril qsp 20 µL. Utilizou-se 2 µL do DNA.	Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Austrália)	50 °C – 2 min 95 °C – 15 min 40X 95 °C – 15 s 60 °C – 1 min
Nested-PCR BLV - externa	Volume final de 20 µL de uma mistura constituída por 0,4 pmol/µL dos iniciadores BLV 1A e 6A; 0,2 mM de DNTPs (Promega, EUA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> (Promega, EUA); Tampão Taq 1x Gotaq <sup>®</sup> Green (Promega, EUA); 0,02 U/µL de Taq Jumpstart (Sigma-Aldrich, EUA) e água tratada com DEPC estéril qsp 20 µL. Na reação foram utilizados 2 µL de DNA.	Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA)	5X 94 °C – 45s 60 °C – 60s 72 °C – 90s 30X 94 °C – 45s 56 °C – 60s 72 °C – 30s 72 °C – 7 min 4 °C – ∞
Nested-PCR BLV - interna	Volume final de 20 µL de uma mistura constituída por 0,4 pmol/µL dos iniciadores BLV 3A e 5A; 0,2 mM de DNTPs (Promega, EUA); 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> (Promega, EUA); Tampão Taq 1x Gotaq <sup>®</sup> Green (Promega, EUA); 0,02 U/µL de Taq Jumpstart (Sigma-Aldrich, EUA) e água tratada com DEPC estéril qsp 20 µL. Na reação foram utilizados 2 µL de DNA amplificado da PCR externa.	Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA)	5X 94 °C – 45 s 58 °C – 60 s 72 °C – 30 s 30X 94 °C – 45 s 53 °C – 60 s 72 °C – 90 s 72 °C – 7 min 4 °C – ∞

### 3.3.3 Análise dos Produtos das PCR

Realizou-se a eletroforese em gel de agarose para analisar os produtos amplificados pelas PCR convencionais. Uma quantidade de 10 µL dos produtos amplificados foi aplicada em géis de agarose 1,5% (p/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL). A eletroforese ocorreu por 40 min a 100 v utilizando um tampão TBE (89 mM Tris-HCl; 2,5 mM EDTA e 89 mM Ácido Bórico pH 8,0). O

produto amplificado foi visualizado por um transiluminador com exposição à luz ultravioleta, fotografado por um sistema de fotodocumentação (Vilber Loumart, EUA) e analisado por comparação a um marcador de tamanho molecular de 100 pb ou 50 pb.

Para as PCR em tempo real para BVDV e Beta-actina, a análise dos produtos amplificados foi estabelecida pelo detector do aparelho que mensurava o sinal fluorescente gerado pelas sondas. As

leituras das fluorescências foram realizadas nos comprimentos de onda de 470 nm (FAM) e 650 nm (CY5), correspondentes aos fluoróforos presentes na sonda de BVDV e Beta-actina, respectivamente. As curvas de amplificação foram geradas através do sinal da fluorescência normalizada (eixo Y) em relação ao número de ciclos (eixo X) (Gibson *et al.*, 1996). Os cálculos da linha de base e do *cycle threshold* (Ct) foram estabelecidos automaticamente pelos softwares dos equipamentos. Em alguns casos, esses parâmetros foram ajustados manualmente em relação aos controles de extração, controles negativos e os controles positivos dos ensaios.

### 3.3.4 Avaliação das PCR

As especificidades dos produtos amplificados e a sensibilidade analítica foram realizadas a fim de avaliar todas as PCR. A PCR para *Mycoplasma (Mollicutes)* foi ainda comparada ao teste de coloração Hoescht 33258, realizado no Laboratório de Cultivo Celular da Escola de Veterinária da UFMG em 26 amostras de linhagens celulares. A estatística Kappa (<http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=Compare2Tests>) foi realizada para estabelecer a concordância entre os métodos e a interpretação do índice Kappa gerado foi realizada conforme proposto por Landis e Koch (1977). As RT-PCR para BVDV foram avaliadas em ensaio de proficiência promovido pela Agência britânica de Laboratórios de Veterinária e Saúde Animal (AHVLA).

#### 3.3.4.1 Especificidades dos produtos amplificados das PCR

A especificidade das PCR foi avaliada utilizando o sequenciamento dos produtos amplificados dos controles positivos. Para os produtos dos controles positivos das PCR de PPV e PCV1, foram realizadas ainda a análise por enzima de restrição.

#### 3.3.4.1.1 Análise por sequenciamento

Os produtos amplificados foram submetidos à purificação utilizando o kit *PureLink™ Kits* (Invitrogen, EUA) com posterior determinação da concentração dos purificados pelo Nanovue (GE Healthcare, EUA). A quantidade de cada insumo utilizado no preparo do *mix* das reações de sequenciamento foi calculada com base no protocolo do Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA) com algumas modificações. A reação foi realizada separadamente empregando os iniciadores direto e reverso de cada PCR no termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation, EUA). Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados conforme procedimento a seguir:

##### - Purificação do produto da reação para sequenciamento

A purificação foi realizada segundo o protocolo proposto por Figueiredo *et al.* (2003) com algumas modificações. A purificação teve início com a adição de 40 µL de isopropanol 65% em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas por inversão e mantidas ao abrigo de luz em temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 11.0000 g por 25 min. Descartou-se com cuidado o sobrenadante e adicionou-se 300 µL de etanol 60%. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados novamente a 11.0000 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e os tubos foram aquecidos em banho seco a 70°C por 2 min para eliminação de resíduos de etanol. Em seguida, foram adicionados 14 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems, EUA). As amostras foram homogeneizadas suavemente com a ajuda das mãos e um *spin* foi realizado na tentativa de reunir todo o DNA presente no tubo.

##### - Eletroforese capilar e análise da sequência

As amostras purificadas foram aplicadas em uma placa de 96 *wells* ou em tubos próprios para o sequenciamento e

submetidas a uma temperatura de 96°C por 3 minutos em termociclador para desnaturação do DNA. Em seguida, foram sequenciadas no aparelho ABI 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystems, EUA). A edição das sequências foi realizada no programa Bioedit v7.0 e os produtos sequenciados foram comparados com as sequências depositadas no Genbank (NCBI).

#### 3.3.4.1.2 Análise por enzima de restrição

Realizou-se também a análise por enzima de restrição para avaliar a especificidade dos produtos dos controles positivos das PCR para PPV e PCV1. O programa Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) e o programa pDRAW 32 foram utilizados para escolha das enzimas de restrição com base nas sequências dos produtos amplificados obtidas *in silico* pelo Primer Blast (NCBI). A reação de restrição enzimática ocorreu por 18h a 37°C para digerir os produtos das PCR para PCV1 e PPV.

#### 3.3.4.2 Sensibilidade Analítica das PCR

A sensibilidade analítica das PCR foi realizada visando determinar o limite de detecção das mesmas frente a diluições dos materiais genéticos dos controles positivos. Os materiais genéticos foram inicialmente mensurados com utilização do equipamento Nanovue (GE Healthcare, EUA) e em seguida submetidos às diluições seriadas. A sensibilidade analítica da PCR para *Mycoplasma* (*Mollicutes*) foi obtida pela diluição do DNA do *Mycoplasma bovis genitalium* de 1:5 a 1:15625. As diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  foram empregadas nos controles positivos para avaliação da sensibilidade analítica das PCR para PCV1, PPV e BLV. Para a avaliação da sensibilidade analítica das RT-PCR em tempo real e RT-PCR convencional para o BVDV, o RNA da cepa não citopática W2

previamente titulada ( $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL) foi diluído em base 10 até a diluição de  $10^{-8}$ .

### 3.4 Sequenciamento em amostras de linhagens celulares

O produto da amplificação dos contaminantes presentes em algumas amostras de linhagens celulares foi submetido ao sequenciamento conforme procedimento descrito no item 3.3.4.1.1.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Padronização das PCR

#### 4.1.1 PCR para avaliação da eficiência das extrações

Para avaliação da eficiência das extrações das amostras, foram utilizadas as PCR para o gene da beta-actina e para o gene GAPDH, considerados genes constitutivos presentes em diferentes tipos de células (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Trabalhos como os desenvolvidos por Ayril *et al.* (2006) e Camargos *et al.* (2008) utilizaram uma PCR para o gene da beta-actina como critério de avaliação dos materiais genéticos extraídos de linhagens celulares. Em nosso trabalho, foi empregada a PCR em tempo real baseado na tecnologia Taqman<sup>®</sup> para o gene da beta-actina conforme proposto por Bielanski *et al.* (2009). Entretanto, algumas modificações nas condições de tempo e temperatura foram realizadas, sendo a padronização desta PCR realizada com controles negativos contendo apenas os reagentes menos o DNA e com o DNA de linhagens celulares de origem bovina (MDBK), suína (PK15) e DNA de rim de bovino. Nas condições de tempo e temperatura descritas na tabela 8 foi possível visualizar a curva de amplificação do DNA das linhagens MDBK, PK15 e do DNA de bovino e não foi verificada nenhuma amplificação nos controles negativos (Figura 1).

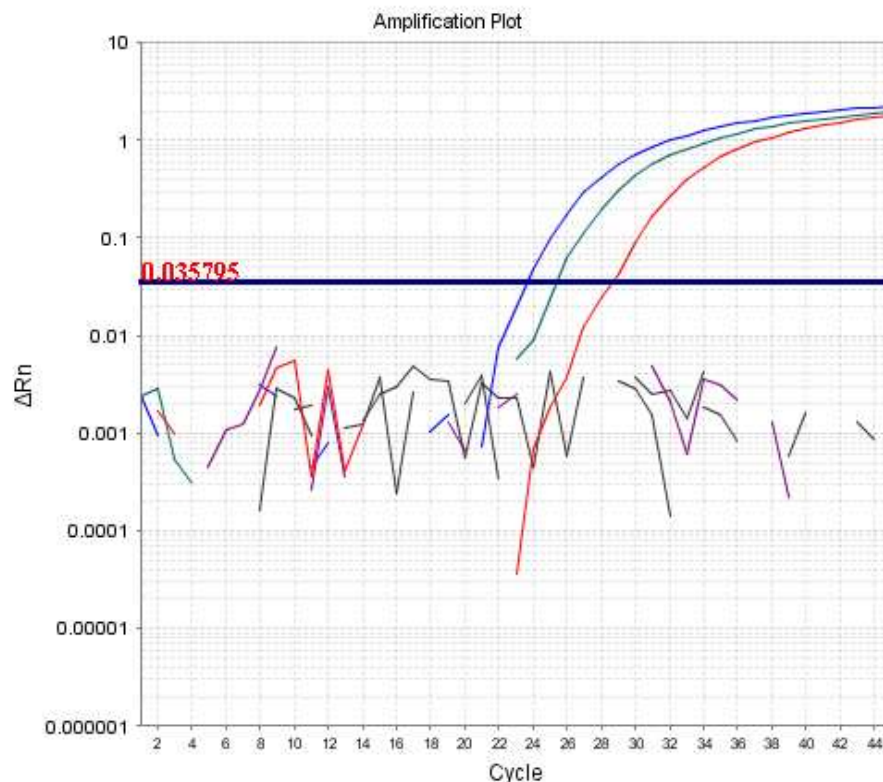


Figura 1 - Curva de amplificação do gene beta-actina presente em MDBK Ct: 23,90 (curva em azul), DNA de bovino Ct: 25,78 (curva em verde) e PK15 Ct: 29,01 (curva em vermelho) através da PCR em tempo real baseado na tecnologia TaqMan<sup>®</sup>. Os traços nas cores roxo e cinza correspondem aos controles negativos da PCR (reagentes menos o DNA).

Para o gene GAPDH, quando a padronização da PCR foi realizada através da otimização das temperaturas de anelamento (50, 52 e 54 °C) e do tempo de extensão (30 e 50 s) em DNA de linhagens celulares de origem de macaco (VERO), MDBK, PK15 e DNA de rim de bovino, a temperatura de anelamento e o tempo de

extensão que forneceram uma maior intensidade das bandas específicas foram, respectivamente, 54°C e 50s. Nas condições descritas na tabela 8 foi possível a visualização das bandas de aproximadamente 708 pb correspondentes a amplificação do gene GAPDH (Figura 2- A e B).

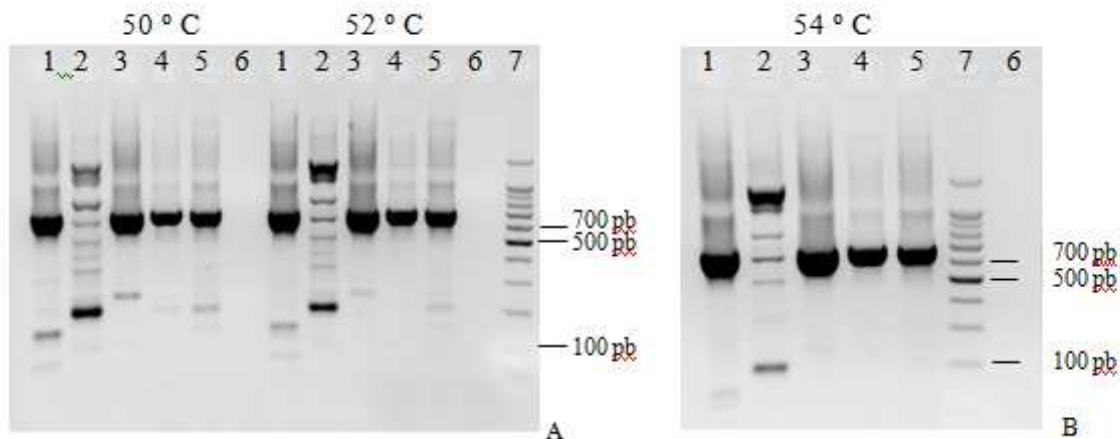


Figura 2-(A e B) – Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação de GAPDH do DNA de diferentes espécies de linhagens celulares em diferentes temperaturas de anelamento através da PCR para o gene GAPDH. Canaleta 1- DNA VERO. Canaleta 2- DNA PK15. Canaleta 3- DNA MDBK. Canaletas 4 e 5- DNA de bovino. Canaleta 6 - Controles negativos (reagentes menos o DNA). Canaleta 7- Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Na figura 2, a temperatura de anelamento de 54°C permitiu uma melhor visualização da banda de aproximadamente 709 pb, correspondente ao gene GAPDH dos DNAs processados e demonstrou a diminuição da intensidade de algumas bandas inferiores a essa presentes principalmente no produto amplificado da célula PK15. Devido a essas razões, essa temperatura foi então selecionada.

#### 4.1.2 PCR para detecção de contaminantes celulares

Foram padronizadas um total de seis PCR para avaliar a presença do material genético de *Mycoplasma (Mollicutes)*, PPV, PCV1, BLV e BVDV (dois ensaios) em amostras de linhagens celulares, soros bovinos e tripsinas extraídas. Esses agentes foram escolhidos neste estudo por existirem relatos na literatura de contaminações celulares ocasionadas pelos mesmos ou pelo fato de órgãos regulamentadores preconizarem o estudo desses em linhagens celulares e seus insumos utilizados para produção de produtos biológicos. Além disso, para o BVDV, muitos laboratórios de virologia realizam

rotineiramente diagnóstico virológico que requer a utilização de cultivos celulares livres desse agente.

Os resultados e discussão das padronizações das PCR foram mostrados por agente, devido às particularidades realizadas em cada PCR.

##### 4.1.2.1 PCR para PPV

Os iniciadores de PPV, desenhados neste trabalho, ao serem submetidos à análise de especificidade *in silico* utilizando os programas Primer Blast e Blast (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) demonstraram uma amplificação somente para o PPV, sendo os genes da VP1/VP2 a região alvo. Esses genes têm sido muito utilizados para determinação de análises filogenéticas de isolados do PPV e embora apresente regiões variáveis entre as amostras de parvovírus, são capazes de detectar o PPV seletivamente (Molitor *et al.*, 1991; Zimmermann *et al.* 2006). Quando avaliada a especificidade analítica dos iniciadores de PPV frente a DNAs não alvos como os DNAs de bovino e suíno, não foi



evidenciada nenhuma amplificação inespecífica.

Na etapa de otimização da PCR, quando foram realizadas as variações nas temperaturas de anelamento (54, 55, 56 e 57°C), a que forneceu o melhor resultado foi

a de 57°C. Nas condições descritas na tabela 8, a PCR foi capaz de amplificar um produto de 408 pb correspondente ao DNA do PPV. A figura 3 apresenta o resultado da amplificação do DNA dos controles positivos de PPV nas diferentes temperaturas de anelamento.

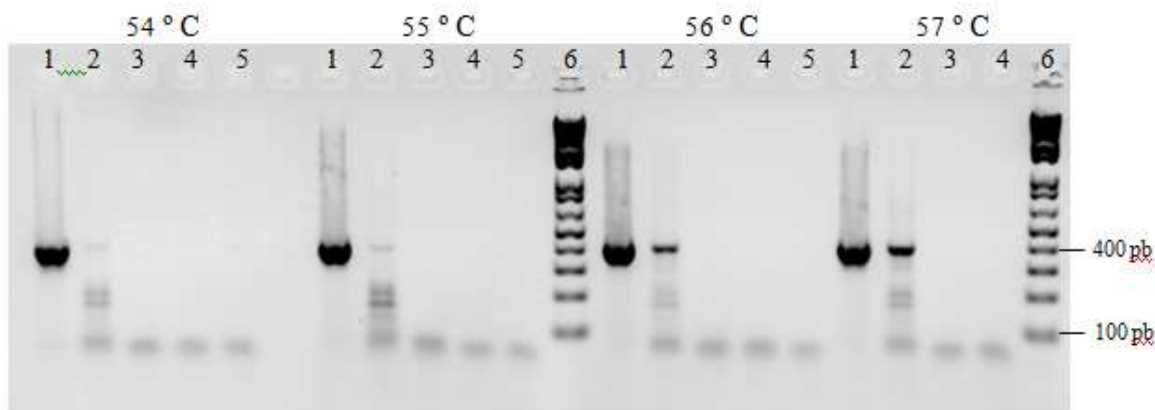


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos produtos de 408 pb do PPV em diferentes temperaturas de anelamento. Canaleta 1: C+ PPV NADL-2 (Origem IPE3). Canaleta 2: C+ PPV cepa NADL-2 (Origem RO1). Canaletas 3 a 5: Controles negativos (reagentes menos o DNA). Canaleta 6: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Na figura 3, observa-se que embora não tenha sido evidenciada a presença de bandas inespecíficas nos controles negativos em nenhuma das temperaturas de anelamento analisadas, optou-se por escolher a temperatura de 57°C devido a obtenção de uma banda de maior intensidade do produto amplificado do PPV cepa NADL-2, como mostrado na canaleta 2.

O produto amplificado de 408 pb do controle positivo de PPV foi submetido ao sequenciamento e à análise por enzima de restrição para determinação da especificidade. O resultado do sequenciamento forneceu uma sequência de nucleotídeos que ao ser comparada com outras sequências disponíveis no GenBank (NCBI,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) demonstraram ser provenientes do Parvovirus Suíno.

Os programas Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) e pDRAW 32 foram utilizados para escolha da enzima de restrição a ser utilizada para determinar a especificidade do produto amplificado do C+ de PPV (figura 4). A partir da sequência de número de acesso JN400519.1 disponível no Genbank obtida pelo Primer Blast (NCBI), foram demonstradas as possíveis enzimas que poderiam clivar esse produto. As enzimas escolhidas foram *HindIII* e *HphI*. O programa pDRAW, ainda, demonstrou *in silico* como seria a eletroforese em gel de agarose da clivagem dessas enzimas (Figura 4).



Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose *in silico* com o auxílio do programa computacional pDRAW32, mostrando os fragmentos gerados através das enzimas de restrição *HindIII* e *HphI*. Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

A tabela 9 apresenta informações dessas enzimas de restrição como número de cortes, posição do sítio de clivagem e sequência de reconhecimento.

A clivagem dessas enzimas no produto amplificado do controle positivo de PPV é mostrada na figura 5.

Tabela 9 – Enzimas de restrição *HindIII* e *HphI* e suas informações como número de cortes, posição do sítio de clivagem e sequência de reconhecimento.

Enzima	Número de Cortes	Posição do sítio de clivagem	Sequência de Reconhecimento (5'-3')
<i>HindIII</i>	1	347	a/agctt
<i>HphI</i>	1	301	gggga(n <sub>8</sub> ) e (n <sub>7</sub> )tcacc

Fonte: Programas WebCutter 2.0 e pDRAW 32.

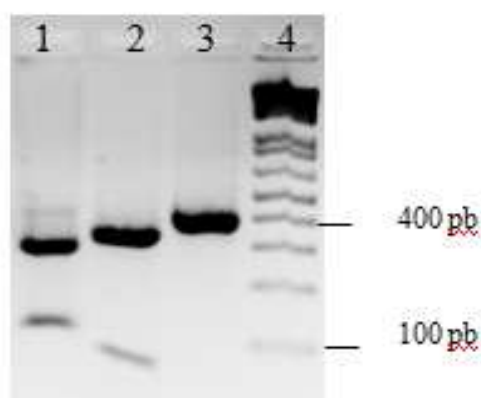


Figura 5 – Análise por enzima de restrição em eletroforese em Gel de agarose 2% dos produtos amplificados do DNA de PPV. Canaleta 1- Produto clivado pela ação da enzima *HphI*. Canaleta 2- Produto clivado pela ação da *HindIII*. Canaleta 3: Produto amplificado do C+ de PPV sem restrição enzimática. Canaleta 4- Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

A partir dos resultados apresentados na figura 5, observa-se que a restrição enzimática garantiu a especificidade do produto amplificado de PPV, uma vez que a clivagem dos mesmos pelas enzimas foi semelhante aos resultados apresentados na figura 4 e na tabela 1.

Molitor *et al.* (1991) padronizaram uma PCR que amplifica o gene da VP2, otimizando o número de ciclos, temperatura de anelamento e a concentração de magnésio a ser aplicada em amostras clínicas e na detecção deste agente como contaminante

em linhagens de células de mamíferos. Esses autores também utilizaram o critério de restrição enzimática para avaliar a especificidade do produto amplificado, sendo a enzima utilizada a *EcoRI*.

A sensibilidade analítica da PCR para PPV foi avaliada com as diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) do DNA do controle positivo cuja concentração inicial foi de 31,5 ng/ $\mu$ L. Este vírus tinha sido previamente titulado por hemaglutinação e apresentou o título hemaglutinante de 128. A figura 6 apresenta a sensibilidade analítica desta PCR.



Figura 6 - Sensibilidade analítica da PCR para PPV com diluições seriadas do DNA desse agente em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Canaletas de 1 a 10 - Diluição do DNA de PPV de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Canaletas 11 e 12 - Controles negativos contendo reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 13 - Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Como observado na figura 6, a sensibilidade analítica foi determinada até a diluição de  $10^{-7}$ , correspondendo a 6,3 fg de DNA do PPV (título hemaglutinante 128), demonstrando assim uma alta sensibilidade. Molitor *et al.* (1991) obtiveram o limite de detecção de 100 fg de DNA desse vírus na padronização de uma PCR convencional para detecção do gene da VP2 do PPV em amostras clínicas e como contaminante celular.

Soares *et al.* (1999) encontraram um resultado semelhante ao determinaram a sensibilidade analítica de uma PCR convencional padronizada para detecção do gene NS1 do PPV à ser aplicada em amostras clínicas e na detecção deste agente como contaminante celular. A sensibilidade desta PCR foi determinada até a diluição de  $10^{-9}$  do DNA de PPV cepa NADL-2 com título hemaglutinante 1024. Esse resultado corrobora o encontrado em nosso estudo, permitindo reforçar a alta

sensibilidade analítica da PCR para PPV encontrada.

#### 4.1.2.2 PCR para *Micoplasma (Mollicutes)*

A PCR para *Micoplasma (Mollicutes)* utilizada neste trabalho foi desenvolvida por Kuppeveld *et al.* (1994) tendo como alvo uma região altamente conservada entre todas as espécies desse gênero, a região 16S do RNA ribossômico (RNAr) e ainda contemplando algumas espécies de microrganismos pertencentes à classe *Mollicutes*. Trabalhos envolvendo a pesquisa desse agente como contaminante celular como os desenvolvidos por Timenetsky *et al.* (2006), Camargos *et al.*

(2008), Cristo e Santos (2009) e Peredeltchouk *et al.* (2011) também utilizaram os iniciadores descritos por Kuppeveld *et al.* (1994).

A PCR foi padronizada tendo como controle negativo os reagentes do *Mix* e como controle positivo, o *M. bovisgenitalium*. Nas condições de tempo e temperatura submetidas, a PCR permitiu identificar um produto de 280 pb, apenas no controle positivo. A especificidade analítica desses iniciadores foi ainda testada com os DNAs de *M. hyopneumoniae*, *M. mycoides* subespécie *mycoides small colony* (MmSC), DNA de bovino e DNA de suíno (Figura 7).

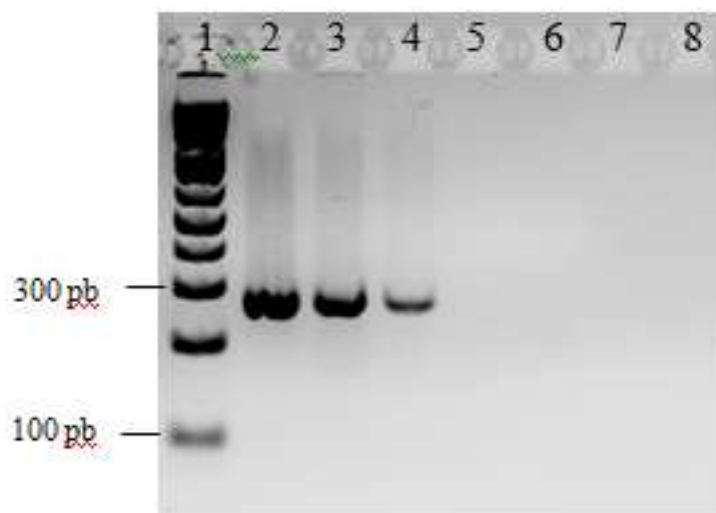


Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a especificidade analítica dos iniciadores utilizados na PCR para *Micoplasma (Mollicutes)*. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: DNA do *M. bovisgenitalium*. Canaleta 3: DNA do *M. hyopneumoniae*. Canaleta 4: DNA do *M. mycoides* subespécie *mycoides small colony* (MmSC). Canaleta 5: DNA de suíno. Canaleta 6: DNA de bovino. Canaletas 7 e 8: Controles negativos contendo somente reagentes da PCR.

Observa-se na figura 7 um produto amplificado de aproximadamente 280 pb, específico para os microrganismos do gênero *Mycoplasma* ssp. somente nos DNAs dos micoplasmas e não houve nenhuma amplificação inespecífica quando os DNAs de bovino e suíno foram submetidos à PCR.

A especificidade analítica do produto amplificado foi confirmada por sequenciamento, fornecendo uma sequência de nucleotídeos que ao ser comparada com outras sequências disponíveis no GenBank (NCBI) pode ser caracterizada como *M. bovisgenitalium*. Entretanto, sequências de nucleotídeos de

outros micoplasmas apresentaram também homologia com a sequência do produto amplificado, mas em menor porcentagem. Esse evento pode ser explicado pelo fato dos iniciadores amplificarem a região 16S do RNAr, conservada entre os micoplasmas.

A sensibilidade analítica da PCR quando avaliada com as diluições seriadas (1:5 a 1:15625) do DNA do *M. bovisgenitalium* (128 ng/ $\mu$ L) foi determinada até a diluição 1:625, correspondendo a um limite de detecção de 0,4 ng de DNA (Figura 8).

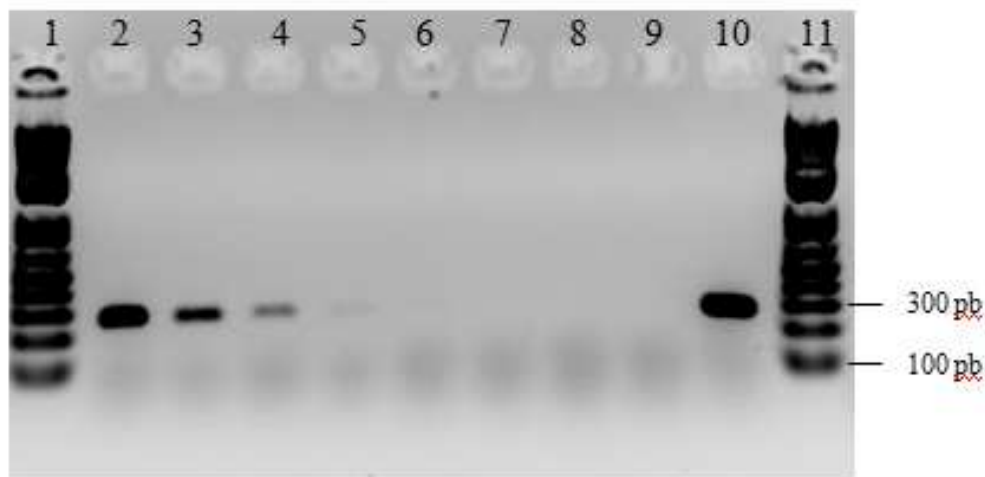


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose apresentando a sensibilidade analítica da PCR para *Micoplasma (Mollicutes)* com diluições seriadas do DNA desse agente. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaletas de 2 a 7: Diluição do DNA de *M. bovisgenitalium* de 1:5 a 1:15625 (na base 5). Canaletas 8 e 9: Controles negativos contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 10: DNA de *M. bovisgenitalium* (puro). Canaleta 11: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Resultado semelhante foi encontrado por Camargos *et al.* (2008) ao avaliar a sensibilidade analítica da PCR utilizada para detecção de *Micoplasma (Mollicutes)* na rotina de cultivos celulares. A PCR padronizada por esses autores possibilitou a detecção do DNA de *M. bovisgenitalium*, também utilizado como controle positivo, até a diluição de 1:300, o que correspondeu a um valor de sensibilidade analítica de 0,33ng de DNA.

Peredeltchouk *et al.* (2011) padronizaram uma técnica de RT-PCR para detecção de *Micoplasmas (Mollicutes)* a fim de aumentar o limite de detecção em relação a uma PCR já utilizada por vários trabalhos presentes na literatura, que inclusive foi a utilizada em

nosso trabalho. Esses autores conseguiram aumentar o limite de detecção em 10 vezes, entretanto, alguns inconvenientes ocorreram como o aparecimento de bandas espúrias.

A PCR padronizada neste estudo foi ainda comparada ao teste de coloração Hoechst em 26 amostras de linhagens celulares de diversas espécies animais e de origem humana. O teste Hoechst foi usado como referência para comparação dos resultados obtidos pela PCR, pois é considerado um método clássico para detecção de micoplasmas em cultivos celulares (Langdon, 2004). Este método possui o princípio de que o corante Hoescht 33258 emite fluorescência sob luz ultravioleta, uma vez ligado no DNA. Diante disso, células

não contaminadas possuirão a fluorescência localizada apenas em seus núcleos. Em contrapartida, células contaminadas apresentarão ainda uma fluorescência no citoplasma das células devido à presença de micoplasma (Wilson e Walker, 1936).

A PCR foi capaz de detectar o material genético do micoplasma (*Mollicutes*) em sete amostras das oito detectadas pelo Hoechst 33258 e não detectou o genoma das espécies deste gênero nas amostras não detectadas por esse método de coloração (Tabela 10).

Tabela 10 - Detecção de Micoplasmas (*Mollicutes*) em amostras de culturas celulares por PCR e coloração de Hoescht 33258.

Coloração de Hoescht 33258	PCR		
	Detectado	Não detectado	Total
Detectado	7	1	8
Não detectado	0	18	18
Total	7	19	26

Os resultados dos testes presentes na tabela 10 foram comparados utilizando a estatística Kappa ( $\kappa$ ) que forneceu o valor de Kappa de 0,9065; proporção da concordância positiva de 0,9333 e proporção da concordância negativa de 0,973. De acordo com as interpretações do

valor de Kappa recomendadas por Landis e Koch (1977), os métodos estão em concordância quase perfeita. A figura 9 ilustra a detecção do DNA de micoplasma pelo método de Hoescht 33258 realizado neste estudo.

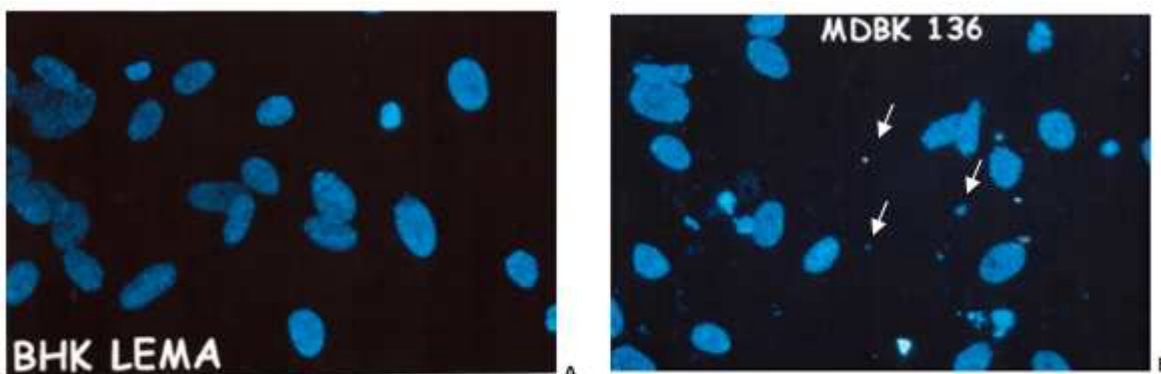


Figura 9 - Método de coloração Hoescht 33258. A: Presença do DNA de micoplasma não evidenciada na célula BHK. B: Presença do DNA de micoplasma detectada na célula MDBK indicadas pelas setas.

Conforme visualizado na figura 9A, a célula BHK apresentou a fluorescência localizada somente no núcleo celular, não evidenciando a presença de micoplasma. Entretanto, a célula MDBK apresentou a fluorescência dispersa, indicando a presença do DNA deste agente (figura 9B).

Timenetsky *et al.* (2006) utilizaram os resultados dos métodos de cultura como referência para comparação com os resultados encontrados da PCR para *Mycoplasma ssp.* (*Mollicutes*) que utilizava os mesmos pares de iniciadores deste trabalho. Em um total de 301 cultivos celulares avaliados pelos dois métodos, a

PCR padronizada por esses autores detectou o gene de *Mycoplasma* ssp. (*Mollicutes*) em 64 amostras das 69 detectadas no método de cultura, não detectando assim o genoma desses agentes em cinco amostras apenas. Em contrapartida, detectou o genoma em 29 amostras que não foram detectadas pelo método de cultura. Com esses resultados, Timenetsky *et al.* (2006) determinaram a sensibilidade da PCR como sendo de 68%, a especificidade de 97% e acurácia de 89%.

#### 4.1.2.3 RT-PCR para BVDV

Foram padronizadas duas RT-PCR para detecção do genoma de BVDV que amplificam a região 5'UTR do genoma viral: uma RT-PCR em tempo real desenvolvida por Bielanski *et al.* (2009) e uma RT-PCR convencional descrita por Ridpath e Bolin (1998).

As RT-PCR foram padronizadas com o RNA da cepa não citopática denominada W2, como controle positivo e com controles negativos contendo somente os reagentes da PCR. Os resultados dessa padronização forneceram um produto amplificado de 283 pb do controle positivo de BVDV na PCR convencional e uma curva de amplificação desse mesmo controle na PCR em tempo real. Em ambas as PCR, não foi evidenciada nenhuma amplificação inespecífica nos controles negativos. A especificidade dos iniciadores utilizados nestas PCR foi avaliada frente ao RNA da cepa do BVDV NADL citopatogênica, RNA do vírus da PSC cepa Bréscia, RNA bovino e RNA suíno que permitiu a amplificação somente no RNA da cepa NADL do BVDV (Figura 10).

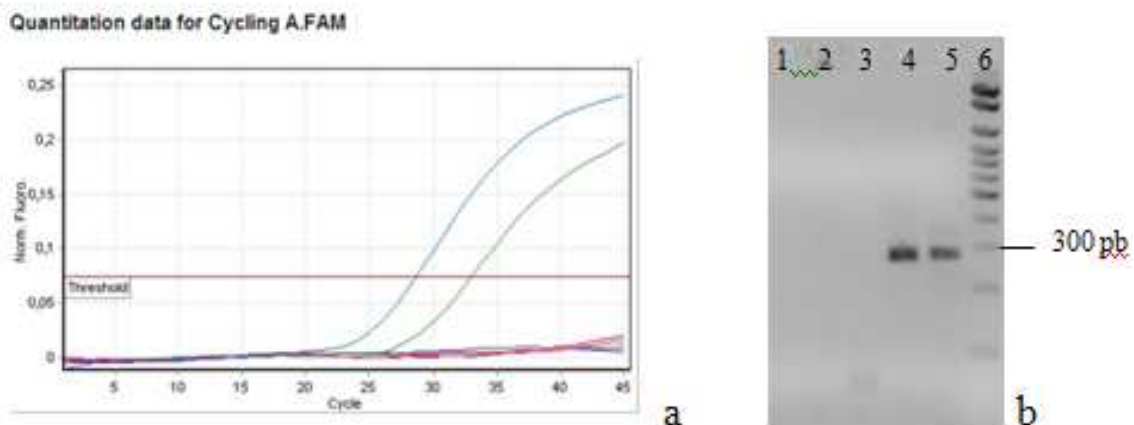


Figura 10 - Especificidade dos iniciadores das RT-PCR em tempo real e convencional para o BVDV. 10a: Curva de amplificação da especificidade analítica dos iniciadores. Curva em azul - Ct: 28,64 (RNA controle positivo BVDV). Curva em verde - Ct: 33,00 (RNA cepa NADL BVDV). Equipamento Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Austrália). 10b: Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a especificidade analítica dos iniciadores da PCR convencional para BVDV. Canaleta 1: RNA vírus da PSC cepa Bréscia. Canaleta 2: RNA de bovino. Canaleta 3: RNA de suíno. Canaleta 4: RNA cepa NADL BVDV. Canaleta 5: RNA controle positivo. Canaleta 6: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

No caso da PCR em tempo real, a especificidade do ensaio foi atribuída à utilização de uma sonda complementar a uma região interna do produto de PCR e apresenta um composto a ela ligado que

emite um sinal fluorescente específico da sequência alvo (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008).

Budhevi e Weinstock (2001) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real



baseada na tecnologia TaqMan para detecção e classificação do BVDV tendo como alvo também a região 5'UTR. Para avaliar a especificidade do ensaio, diferentes cepas referência desse vírus, incluindo a cepa NADL e outros vírus de bovinos, tais como o rotavírus bovino, coronavírus bovino, vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, dentre outros, foram testados na PCR em tempo real. A PCR permitiu identificar, corretamente, através do uso de sondas específicas todas as cepas do BVDV e não foi capaz de identificar os outros vírus de bovinos.

Considerando os resultados encontrados por Budhevi e Weinstock (2001), em nosso estudo, especial atenção foi dada a utilização de um RNA de outro pestivirus, do vírus da PSC, devido à grande importância

do diagnóstico diferencial entre os vírus desse gênero.

Na RT-PCR convencional, a especificidade do produto amplificado foi determinada através do sequenciamento do controle positivo de BVDV que indicou uma sequência de nucleotídeos provenientes desse vírus. Weinstock *et al.* (2001), na avaliação da especificidade dos produtos amplificados da RT-PCR para o BVDV, padronizada para ser aplicada em amostras de pool de soros de bovinos, realizaram também o sequenciamento dos produtos amplificados de cepas referências do BVDV.

As sensibilidades analíticas das RT-PCR convencional e em tempo real foram determinadas através de diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) do RNA do BVDV não citopático W2 previamente titulado, contendo  $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL (Figura 11).

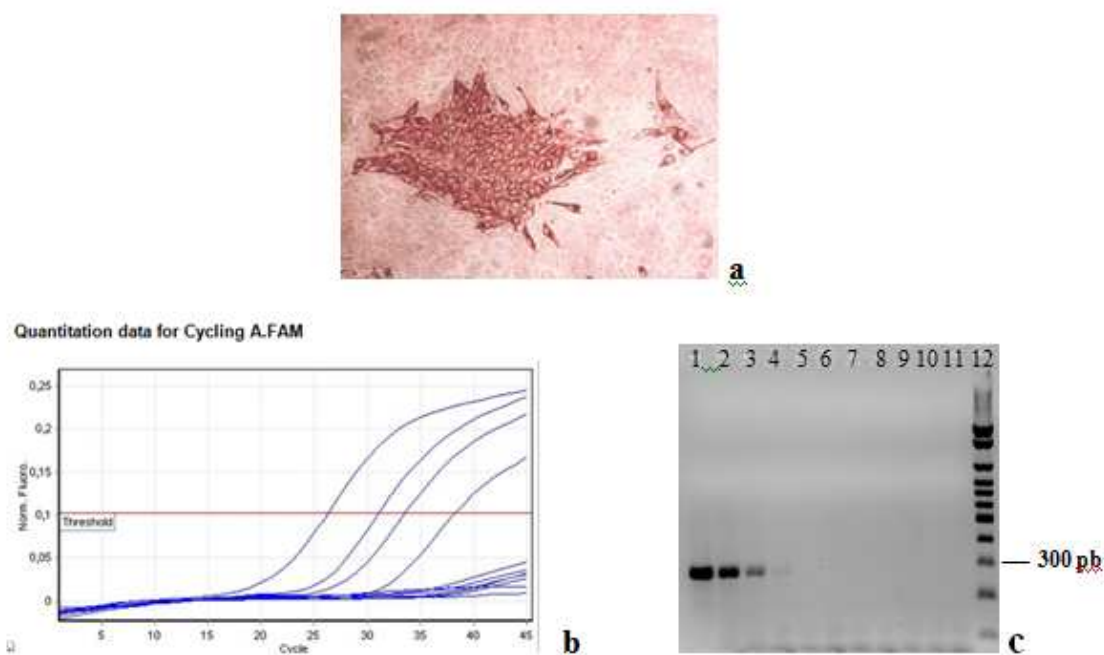


Figura 11 - Sensibilidade analítica das RT-PCR para o BVDV a partir de diluições seriadas do RNA do controle positivo. 11a: Cepa BVDV não citopática W2 utilizada na determinação da sensibilidade analítica das RT-PCR, titulada e visualizada pela técnica de imunoperoxidase (aumento 100x). 11b: Curva de amplificação das diluições seriadas do RNA do controle positivo (C+) de BVDV ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) constando as curvas do RNA C+ puro (Ct: 26,33), RNA C+  $10^{-1}$  (Ct: 31,08), RNA C+  $10^{-2}$  (Ct: 33,63), RNA C+  $10^{-3}$  (Ct: 38,30). Foram utilizados dois controles negativos contendo os reagentes da PCR menos DNA. Equipamento Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Austrália). 11c: Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a sensibilidade analítica da PCR convencional para BVDV com diluições seriadas do RNA do controle positivo. Canaletas de 1 a 8: Diluição do RNA de BVDV de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ . Canaletas 9 a 11: Controles negativos contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 12: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.



As duas RT-PCR detectaram o RNA do controle positivo até a diluição de  $10^{-3}$ , o que correspondeu a um limite de detecção de  $10^{2,8}$  TCID<sub>50</sub>/mL.

Resultados semelhantes foram encontrados por Fulton *et al.* (1999) quando padronizaram uma nested-RT-PCR para classificar cepas referências do BVDV, vacinas de bovinos contendo vírus vivo modificado e cepas referências do vírus da Doença das Fronteiras. Ao avaliar a sensibilidade analítica frente a 3 cepas do BVDV (Nebraska, NADL e 890), esses autores verificaram uma sensibilidade de  $10$  TCID<sub>50</sub>/0,025 mL, o equivalente a  $10^{2,6}$  TCID<sub>50</sub>/mL.

Embora trabalhos na literatura relatem uma maior sensibilidade analítica da RT-PCR em tempo real em relação à convencional para o BVDV (Bhudevi e Weinstock, 2001), em nosso estudo a sensibilidade de ambas foi equivalente. A PCR em tempo real é considerada uma técnica mais rápida em relação à PCR convencional, pois permite que a amplificação e a detecção ocorram simultaneamente em um sistema fechado, não necessitando assim da realização da eletroforese em gel de agarose (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A PCR convencional permite com maior facilidade a realização de sequenciamento genômico a partir do produto amplificado, sem haver necessidade, dependendo do tamanho do fragmento gerado, de realização de clonagem para posterior realização do sequenciamento. Além disso, a realização de ensaios de restrição enzimática quando são gerados fragmentos de tamanhos maiores que a PCR em tempo real também é facilitada com a realização da PCR convencional. Entretanto, a PCR em tempo real apresenta elevada especificidade atribuída ao uso de sondas específicas.

Diante disso, as duas técnicas são de extrema valia como ferramentas a serem aplicadas, por exemplo, em diagnóstico, podendo inclusive ser utilizadas em

conjunto refinando ainda mais os resultados.

As RT-PCR em tempo real e convencional padronizadas neste estudo foram ainda utilizadas em novembro de 2011, em ensaio de proficiência promovido pela agência britânica AHVLA que enviou quatro amostras de sangue de bovino para serem processadas e testadas quanto a presença ou ausência do RNA de BVDV. Todas as amostras foram exatamente caracterizadas quanto à detecção ou não do RNA deste agente pelas duas metodologias. Esses resultados reforçam ainda mais a aplicação dessas duas técnicas de PCR na detecção do BVDV.

#### 4.1.2.4 PCR para PCV1

A especificidade dos iniciadores de PCV1 desenhados neste trabalho foi avaliada *in silico* utilizando os programas Primer Blast e Blast (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que demonstraram uma amplificação somente para o PCV1, sendo a região alvo o gene *Cap* (ORF2). De acordo com Morozov *et al.* (1998), essa região é considerada espécie-específica para determinação dos PCV.

Além disso, a especificidade analítica desses iniciadores foi determinada frente ao DNA de um isolado de PCV2, gentilmente cedido pela Escola de Veterinária da UFMG e com os DNA de suíno e bovino. Os resultados da PCR mostraram que os iniciadores não se anelaram a nenhum desses DNAs não alvos.

Quando a PCR para PCV1 foi submetida a variações na temperatura de anelamento (54, 55, 56 e 57°C) e na concentração dos iniciadores (10 e 20 pmoles), a temperatura de anelamento escolhida foi a de 57 °C e a concentração de iniciadores de 20 pmoles. Diante dessas condições, a PCR foi capaz de amplificar um produto de aproximadamente 283 pb, correspondente ao DNA de PCV1 (Figura 12).

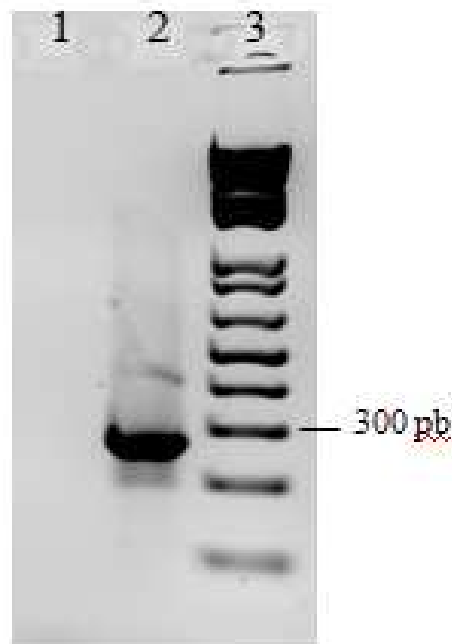


Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1,5 % apresentando a amplificação do DNA do controle positivo de PCV1. Canaleta 1: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 2: DNA do PCV1. Canaleta 3: Padrão de tamanho molecular de 100 pb

O sequenciamento e a análise por enzima de restrição foi realizada para determinação da especificidade do produto amplificado de 283 pb do controle positivo. Ao comparar a sequência de nucleotídeos obtida pelo sequenciamento do controle positivo com outras sequências disponíveis no GenBank (NCBI), o resultado indicou uma sequência de nucleotídeos proveniente do PCV1.

Baylis *et al.* (2011) também utilizaram o sequenciamento como critério de avaliação da identidade dos produtos amplificados da PCR convencional padronizada por eles que amplifica também o gene *Cap* para ser aplicada na detecção do DNA desse agente em vários lotes comerciais de uma vacina contra a rotavirose humana.

Para análise de restrição, a sequência de número de acesso JN133303.1 disponível no Genbank obtida pelo Primer Blast (NCBI) foi inserida nos programas Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) e pDRAW 32 que permitiram a escolha da enzima de restrição *HpaI* (KspAI), para ser utilizada na determinação da especificidade do produto amplificado do C+ de PCV1.

Análises *in silico* obtidas por esses programas permitiram inferir que essa enzima apresenta um sítio de clivagem na posição 195, sendo a sequência de reconhecimento (GTT' AAC) gerando os fragmentos de tamanho 195 e 88 pb (Figura 13A). A clivagem prática da *HpaI* no produto amplificado do controle positivo de PCV1 é mostrada na figura 13B.

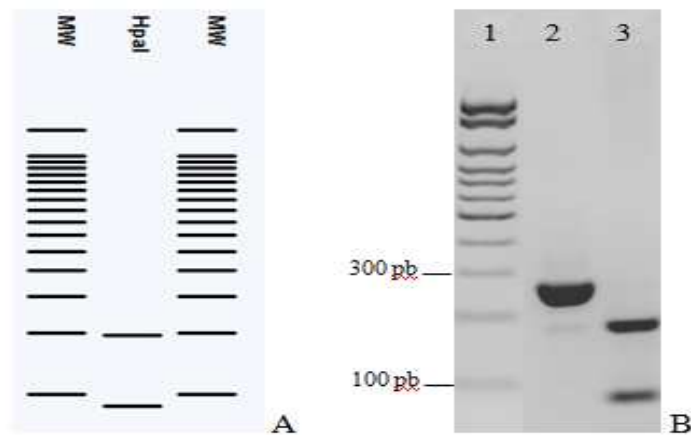


Figura 13 - **A.** Eletroforese em gel de agarose *in silico* com o auxílio do programa computacional pDRAW32 mostrando os fragmentos gerados através da enzima de restrição *HpaI*. Padrão de tamanho molecular de 100 pb. **B.** Eletroforese em Gel de agarose 2% apresentando análise por enzima de restrição do DNA de PCV1. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: Produto amplificado do C+ de PCV1 sem restrição enzimática. Canaleta 3: Produto clivado pela ação da enzima *HpaI*.

O resultado da restrição enzimática conforme visualizado na figura 13A foi semelhante com a restrição esperada obtida *in silico* (figura 13B). A restrição enzimática permitiu confirmar a especificidade do controle positivo de PCV1, uma vez que gerou os esperados fragmentos de 195 e 88 pb resultantes da clivagem da *HpaI* no produto amplificado.

A sensibilidade analítica da PCR para PCV1 foi avaliada com as diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) do DNA do controle positivo, cuja dosagem inicial mensurada pelo NanoVue® (GE Healthcare, EUA) foi 134 ng/ $\mu$ L. A figura 14 apresenta a sensibilidade analítica desta PCR.

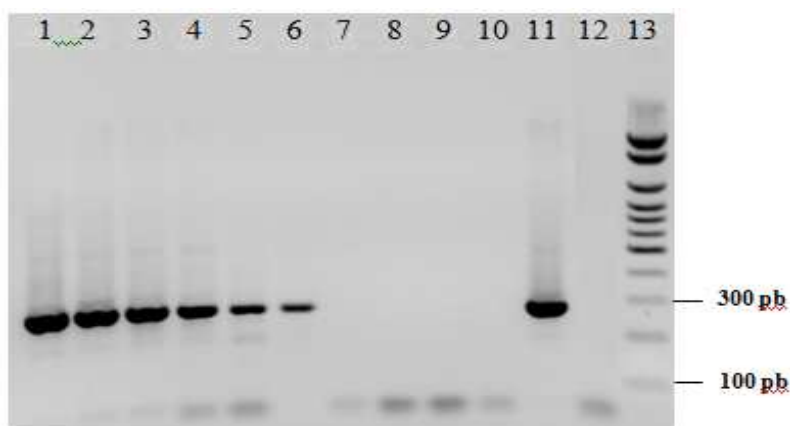


Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a sensibilidade analítica da PCR para PCV1 com diluições seriadas do DNA desse agente. Canaletas de 1 a 10: Diluição do DNA de PCV1 de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Canaleta 11: DNA de PCV1 (puro). Canaleta 12: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 13: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Como visualizado nesta figura, a sensibilidade analítica da PCR foi determinada até a diluição de  $10^{-6}$ , correspondente a 268 fg de DNA de PCV1.

Resultado semelhante foi encontrado por Kumar *et al.* (2012) ao determinarem a sensibilidade analítica de duas PCR convencionais padronizada por eles para ser aplicada na detecção do PCV1 em vacinas e insumos necessários para a sua produção. As PCR convencionais com os iniciadores 3F-5R e 3F-4R apresentaram as suas sensibilidades analíticas frente ao controle positivo de PCV1 presente na célula PK15 diluído em base 10, nas diluições de  $10^{-7}$  e  $10^{-10}$ , respectivamente.

#### 4.1.2.5 PCR para BLV

Foi utilizada uma nested-PCR que amplifica a região do gene *env* presente no genoma viral do BLV, região altamente conservada (Tests..., 2008). Essa metodologia é recomendada pela OIE para detecção do DNA proviral do BLV e está descrita no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2011* (Manual..., 2008).

As PCR externa e interna foram padronizadas com controles negativos contendo os reagentes da PCR menos o DNA e com o controle positivo sendo o DNA extraído da linhagem celular de rim de ovelha (FLK). Nas condições de tempo e temperatura submetidas, as PCR externa e interna foram capazes de amplificar produtos de 440 e 341pb, respectivamente, apenas no controle positivo (Figura 15).

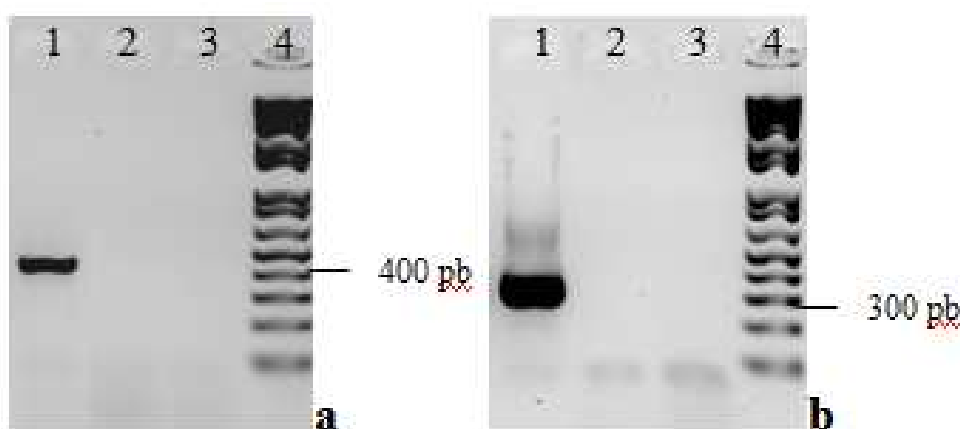


Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando os produtos amplificados da PCR externa (a) e interna (b) para o BLV. Canaletas 1: Controle positivo de BLV. Canaletas 2 e 3: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaletas 4: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

A especificidade analítica desses iniciadores foi ainda testada com os DNAs de bovino e DNA de suíno que não permitiu nenhuma amplificação inespecífica com esses DNAs não alvos. A especificidade analítica do produto amplificado da nested-PCR foi

confirmada pelo sequenciamento gerando uma sequência de nucleotídeos obtida dos gene *env* que em comparação com outras sequências disponíveis no GenBank (NCBI) correspondiam às sequências do BLV.

A sensibilidade analítica da nested-PCR quando avaliada com as diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ ) do DNA do C+ de BLV (551 ng/ $\mu$ L) foi determinada até a diluição

$10^{-4}$ , correspondendo a um limite de detecção de  $1,10 \cdot 10^{-3}$  ng de DNA proviral (Figura 16).

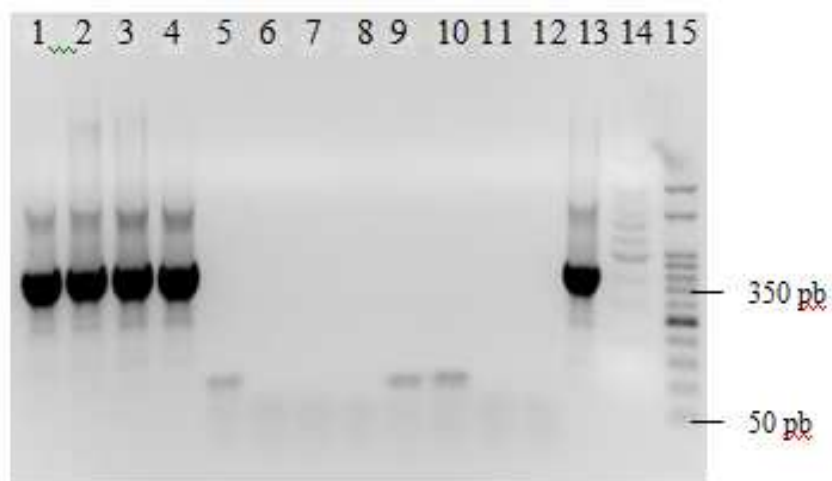


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a sensibilidade analítica da nested-PCR para BLV com diluições seriadas do DNA desse agente. Canaletas de 1 a 10: Diluição do DNA de BLV de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$ . Canaletas 11 e 12: Controle negativo contendo reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 13: Controle positivo de BLV. Canaleta 14: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 15: Padrão de tamanho molecular de 50 pb.

Rola e Kuzmak (2002) encontraram resultado semelhante quando avaliaram a sensibilidade da nested PCR padronizada por eles, que também tinha como alvo a região *env* do genoma do provirus do BLV e apresentou a sensibilidade analítica cerca de  $10^{-2}$  ng do DNA proviral.

#### 4.2 Aplicações das PCR em amostras de linhagens celulares, soros bovinos e tripsinas

As PCR depois de padronizadas foram utilizadas como ferramenta na detecção de *Mycoplasma (Mollicutes)*, PPV, PCV1, BLV e BVDV em linhagens celulares, soros e tripsinas. Conforme elucidado nos itens 3.2.2 e 3.2.3 dos Materiais e Métodos foram analisadas 88 amostras de cultura celular, na forma de suspensão, pertencentes a 32 linhagens celulares provenientes dos laboratórios de redes oficiais RO1, RO2, RO3, RO4, RO5 e dos laboratórios de instituições de ensino e pesquisa IPE1,

IPE2, IPE3. Foram ainda analisadas 10 amostras de lotes diferentes de tripsinas (apresentadas na forma de pó) correspondentes a seis fabricantes e 13 amostras de lotes diferentes de soro bovino correspondentes a 11 fabricantes utilizadas pelos laboratórios RO1, RO2, RO3, RO5 e IPE3.

Os materiais genéticos (DNA e RNA) extraídos a partir dessas amostras foram avaliados com a utilização das PCR padronizadas para genes normalizadores: PCR em tempo real para beta-actina e PCR convencional para GAPDH. Esta última somente foi utilizada quando o gene da beta-actina não foi detectado.

A PCR em tempo real para o gene da beta-actina foi realizada primeiramente, devido ao fato de ser mais rápida em relação à PCR convencional para GAPDH, pois não requer a realização da eletroforese em gel de agarose. Entretanto, devido à

diversidade de espécies celulares analisadas e para não ocorrer a possibilidade de invalidar alguma amostra, caso não fosse detectado o gene da beta-actina, recorreremos também à PCR para o gene GAPDH.

Das 88 amostras de DNA e RNA extraídas a partir das culturas celulares, submetidas à PCR para genes normalizadores, apenas uma amostra de origem de inseto, TN5B, cedida pelo laboratório IPE3 não apresentou a detecção desses genes. Entretanto, essa amostra foi mantida no estudo.

Quando realizadas as PCR para os genes normalizadores nos materiais genéticos extraídos dos soros bovinos, onze das treze

amostras de DNA de soro bovino amplificaram o gene da beta-actina, sendo que duas amostras não detectadas para esse gene permaneceram não detectadas para o GAPDH. Além disso, dessas treze amostras submetidas à extração de RNA, apenas três apresentaram detecção somente para o gene da beta-actina.

Nas amostras de tripsina submetidas à extração de RNA e DNA, apenas em uma amostra de DNA foi detectada somente o gene da beta-actina.

A figura 17 ilustra as curvas de amplificação da PCR para beta-actina nas amostras de DNA de soros bovinos e tripsinas.

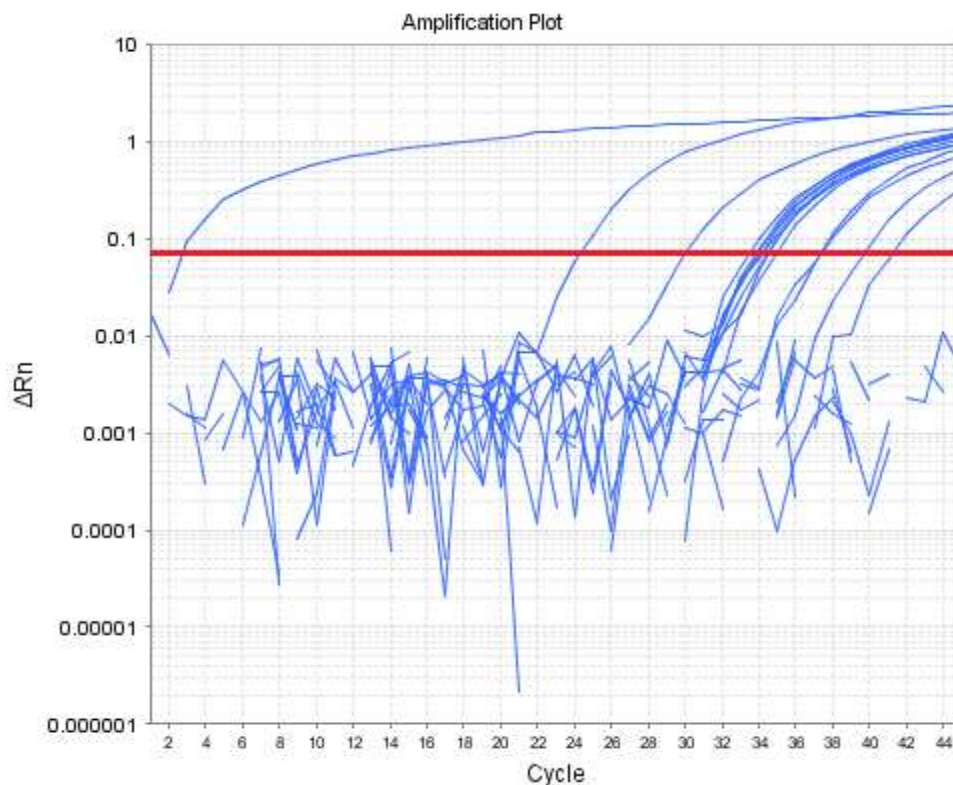


Figura 17 - Curva de amplificação do gene beta-actina presente em amostras de DNA de soros bovinos e tripsinas através da PCR em tempo real baseado na tecnologia TaqMan®. Equipamento Real Time PCR 7500® Fast System (Applied Biosystems, EUA).

Embora os resultados das PCR para os genes normalizadores não tenham sido completamente satisfatórios em todas as amostras de insumos testados, nenhuma amostra foi retirada do estudo em face de: i) acreditar que os resultados insatisfatórios das PCR para os genes normalizadores nas amostras anteriormente citadas se devem provavelmente ao fato dessas apresentarem pouca quantidade de material genético, de modo que não foi garantida a amplificação dos genes em estudo. ii) devido à possível presença de inibidores como proteínas presentes nesses tipos de amostra, que mesmo sendo utilizado um método de extração que possua etapas de desnaturação dessas substâncias, como é o caso do método utilizado neste estudo, o

Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 2001), podem ainda permanecer resíduos dessas proteínas. Isto foi evidenciado em parte através da relação DNA/proteína ou RNA/proteína dos materiais genéticos extraídos das amostras de insumos estabelecida pelo equipamento Nanovue® (GE Healthcare, EUA). Os resultados dessa relação variaram de 1,2-1,8 (DNA) e 1,4-1,7 (RNA), diferindo da relação ideal de DNA ou RNA/proteína que deve contemplar uma faixa de 1,8-1,9 para DNA e 1,9-2,0 para RNA (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Os resultados das PCR para *Mycoplasma (Mollicutes)*, PPV, PCV1, BLV e BVDV nos materiais genéticos extraídos das amostras de linhagens celulares estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11- Resultados encontrados por agente contaminante nas linhagens celulares dos laboratórios participantes

Laboratório	Origem da Linhagem	Linhagem	Número de partidas	Quantidade de detecção por agente contaminante				
				Mycoplasma ( <i>Mollicutes</i> )	PCV1	BLV	PPV	BVDV
RO1 (Total=25)	Bovina	MDBK	4	1	-	-	2	2
		PK15	4	-	3	-	4	-
	Suína (Total=10)	SK6	4	-	4	-	4	2
		ST	1	-	-	-	1	-
		LLCPK-I	1	1	1	-	1	-
	Macaco (Total=3)	VERO	2	-	-	-	1	-
		MA 104	1	-	1	-	1	-
	Hamster	BHK21	3	1	-	-	1	-
	Coelho	RK13	2	-	-	-	-	2
	Felino	CRFK	3	-	1	-	3	-
Detectado por agente/lab				3	10	-	18	6
RO2 (Total=6)	Macaco	VERO	3	3	-	-	-	-
	Bovina	MDBK	1	1	-	-	-	1
		PK15	1	-	1	-	-	-
	Suína (Total=2)	SK6	1	-	1	-	-	-
Detectado por agente/lab				4	2	-	1	
RO3 (Total=4)	Macaco	VERO	1	1	-	-	-	-
	Bovina	MDBK	2	2	-	-	-	-
		ST	1	1	1	-	-	-
Detectado por agente/lab				4	1	-	-	
RO4 (Total=8)	Bovina	MDBK	3	2	-	-	-	-
	Suína	PK15	2	1	2	-	-	-
	Macaco	VERO	1	1	-	-	-	-
	Camundongo	BHK21	2	-	1	-	-	-
	Detectado por agente/lab				4	3	-	-
RO5 (total=3)	Macaco (Total=2)	VERO	1	1	1	-	-	-
		FRHK	1	1	1	-	-	1
	Humana	HEP G2	1	1	-	-	-	1
Detectado por agente/lab				3	2	-	2	

continua...

continuação

Laboratório	Origem da Linhagem	Linhagem	Número de partidas	Quantidade de detecção por agente contaminante				
				Micoplasma ( <i>Mollicutes</i> )	PCV1	BLV	PPV	BVDV
IPE1 (Total=2)	Bovina	MDBK	1	1	1	-	1	-
	Macaco	MA 104	1	1	1	-	1	-
	Detectado por agente/lab			2	2	-	2	-
IPE2 (total=1)	Macaco	VERO	1	1	1	-	-	-
	Detectado por agente/lab			1	1	-	-	-
IPE3 (total=39)	Bovina (Total=4)	MDBK	2	-	-	-	2	2
		EBTr	1	1	-	-	-	1
		BT	1	-	-	-	1	-
		PK15	4	-	3	-	3	2
	Suína (Total=7)	SK6	1	-	1	-	-	-
		ST	1	-	1	-	1	-
		IBRS2	1	1	-	-	-	1
	Macaco (Total=5)	VERO	2	-	1	-	2	-
		MA 104	1	1	-	-	1	-
		BGM	1	1	-	-	1	-
		BSC 40	1	1	-	-	1	-
		Detectado por agente/lab			9	10	3	32
	Hamster (Total=2)	BHK	1	-	-	-	1	-
		CHO-K1	1	-	-	-	1	-
	Rato (Total=2)	McCoy	1	-	1	-	1	-
		N2A	1	-	-	-	1	-
	Camundongo (Total=2)	L929	1	-	-	-	1	-
		RAW	1	-	-	1	1	1
	Coelho	RK13	1	-	-	-	1	1
Felino (Total=3)	CRFK	1	-	-	-	1	-	
	CC 81	1	-	-	-	1	1	
	G355	1	1	-	-	1	-	
Cordeiro	FLK	3	2	2	2*	2	3	
Canino	MDCK	2	1	-	-	2	-	
Humano (Total=2)	Hela	1	-	1	-	-	-	
	INT407	1	-	-	-	-	-	
Inseto (Total=4)	TN5B	2	-	-	-	2	-	
	SF21	1	-	-	-	1	-	
	C6/36	1	-	-	-	1	-	
Equino	ED	2	-	-	-	2	1	

-: não detectado / +: detectado -: não detectado/ +: detectado

\*: Linhagens FLK persistentemente infectada com BLV.

### Micoplasma (*Mollicutes*)

Neste estudo, foi encontrado o DNA do Micoplasma (*Mollicutes*) em 30 das 88 amostras de culturas celulares, correspondendo a uma ocorrência de 33,3 % destes agentes (tabela 11). Esses resultados são semelhantes ao encontrado por Timenetsky *et al.* (2006) que observaram a ocorrência de 30,9% de *Mollicutes* em um total de 301 culturas celulares avaliadas. Já Camargos *et al.*

(2008) encontraram 19,27% (16/83) de positividade em partidas de células provenientes de dois laboratórios e Brinzeu *et al.* (2008) que verificaram 11,65% das culturas celulares contaminadas pelo *Mycoplasma ssp.* em um total de 34 culturas celulares.

A figura 18 apresenta o número de amostras detectadas quanto à presença do DNA do micoplasma em relação ao número de amostras processadas por laboratório.



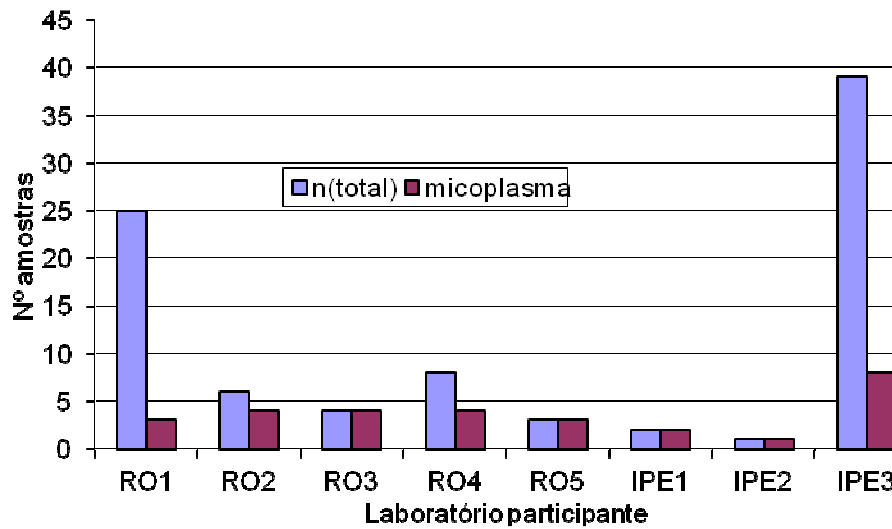


Figura 18: Número de culturas celulares detectadas com DNA de Micoplasma (*Mollicutes*) em relação ao número de amostras processadas por laboratório.

Observa-se que o DNA deste agente foi detectado em células de todos os laboratórios avaliados, indicando que o mesmo é encontrado com grande frequência em células animais cultivadas *in vitro* (Mirjalili *et al.*, 2005). Esses resultados podem ser atribuídos à realização de técnicas inadequadas de manipulação ou indiretamente através de insumos como

soros e tripsinas de origem animal como já relatado em outros trabalhos (Polak-Vogelzang *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2007).

Os resultados da PCR para Micoplasma (*Mollicutes*) nas amostras de DNA de algumas culturas provenientes do laboratório IPE3 estão ilustrados na figura 19.

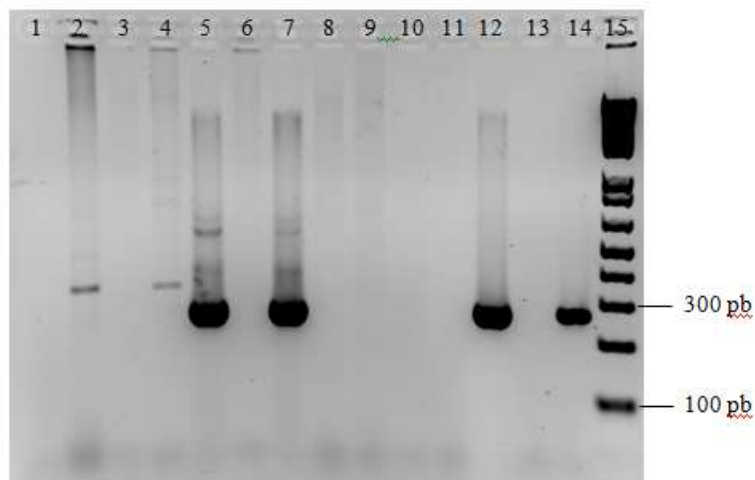


Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos DNA das amostras do laboratório IPE3 pela PCR para Micoplasma (*Mollicutes*). Canaletas 1-4, 6, 8-10: Amostras não detectadas (SF21, N2A, FLK, McCoy, RK13, MDBK, BHK e VERO). Canaletas 5, 7 e 12: Amostras detectadas (IBRS2, FLK e BGM). Canaleta 11: Controle da extração. Canaleta 13: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 14: *M.bovigenitalium* (C+). Canaleta 15: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Foi utilizado o sequenciamento a partir dos produtos amplificados de 04 amostras de DNA das culturas celulares escolhidas aleatoriamente nas quais foi evidenciada a presença do genoma de *Mycoplasma* (*Mollicutes*). As amostras selecionadas foram: BHK21 (RO1), MDBK (RO2), FLK e BSC40 (IPE3). Os resultados das sequências obtidas através do sequenciamento demonstraram, respectivamente, nessas amostras sequências da região 16S do RNAr do *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma hyorhinis* e novamente *Mycoplasma arginini*.

O *Acholeplasma laidlawii* e o *Mycoplasma arginini* são encontrados em culturas celulares como contaminantes originados de soro fetal bovino ou de soro bovino de recém-nascido. Já a tripsina se constitui uma fonte importante de *Mycoplasma hyorhinis* (Barile *et al.*, 1973). Diante dos resultados encontrados através do sequenciamento, acredita-se que os insumos foram uma das prováveis fontes de introdução dessas espécies de micoplasmas nas culturas celulares.

Além disso, observa-se que o sequenciamento permitiu confirmar a especificidade desses produtos amplificados, uma vez que a PCR para *Mycoplasma* (*Mollicutes*) utilizada neste estudo apresenta como alvo a região 16S do genoma dos microrganismos pertencentes à classe *Mollicutes*.

Estes resultados evidenciam a importância do *Mycoplasma* (*Mollicutes*) na cultura celular, que continua sendo, até os tempos atuais, um dos principais agentes de contaminação dos cultivos celulares.

## PCV1

Conforme visualizado nas tabelas 11 e 12, o DNA do PCV1 foi detectado em 31 das 88 amostras de cultura celular, apresentando assim uma ocorrência de 35,2 % deste agente. Além disso, o DNA de PCV1 foi detectado em maior parte nas células de origem suína. Entretanto, a detecção do DNA deste agente foi também evidenciada em células de origem bovina, humana, de macaco, rato e ovelha.

Esses resultados diferem dos encontrados por Ma *et al.* (2011) que não conseguiram detectar o DNA deste agente através de uma nested-PCR em linhagens de humano HEK-293, HeLa e A549 e na linhagem de canino MDCK. No entanto, os autores detectaram o DNA de PCV1 em linhagens MDBK utilizada para produção de vacinas animais.

Resultado semelhante ao encontrado em nosso estudo foi estabelecido por Baylis *et al.* (2011) que evidenciaram o DNA deste agente nas linhagens de epitélio de rim de suíno (PS), em células de humano (HEK293) e células de macaco (VERO) após serem infectadas com o PCV1 provenientes de uma linhagem celular e de uma vacina contra rotavirose humana. Entretanto, esses autores evidenciaram os transcritos de PCV1 por RT-PCR nessas células avaliadas somente quando a infecção foi estabelecida por esse agente proveniente de uma linhagem celular, não evidenciando os transcritos a partir da infecção estabelecida pelo agente presente na vacina.

A figura 20 apresenta o número de culturas celulares detectadas com genoma de PCV1 em relação ao número de amostras processadas por laboratório.

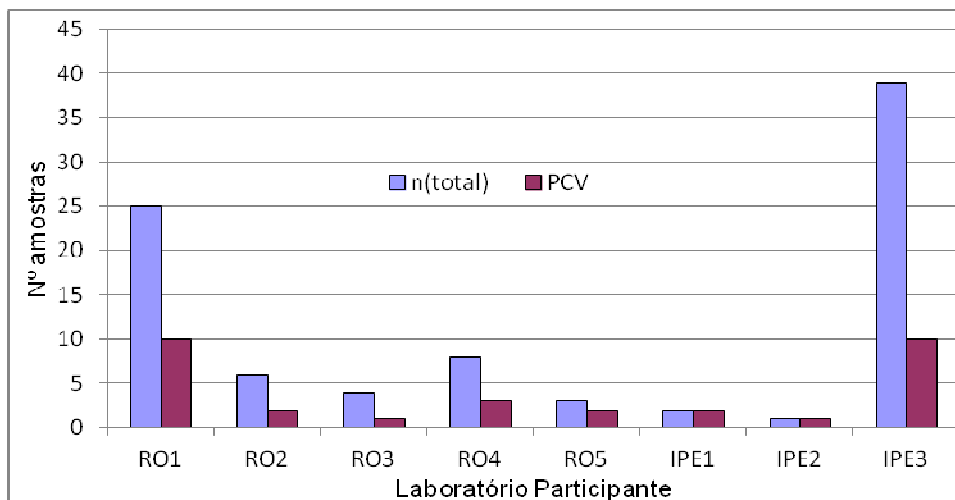


Figura 20: Número de culturas celulares detectadas com genoma de PCV1 em relação ao número de amostras processadas por laboratório.

De modo semelhante ao encontrado para micoplasma, o PCV1 foi detectado em células de todos os laboratórios participantes. Merten (2002) aponta como fonte de contaminação biológica, a aquisição de culturas previamente contaminadas. Em nosso estudo, apesar de não constar dados referentes à identificação dos laboratórios participantes por razão de confidencialidade, provavelmente os resultados obtidos se devem ao câmbio de

culturas celulares realizados entre a maioria dos laboratórios participantes, prática esta bastante realizada entre laboratórios de cultivos celulares ou ainda através da utilização de insumos como soros e tripsinas contaminados com este agente.

A figura 21 apresenta a amplificação de algumas amostras de DNA de culturas celulares provenientes do laboratório IPE3 submetidas à PCR para PCV1.

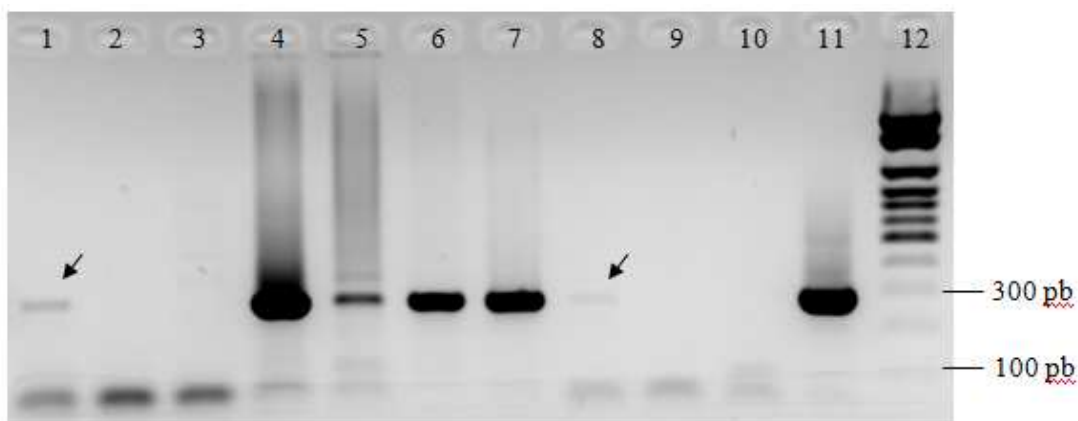


Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos DNA das amostras do laboratório IPE3 através da PCR para PCV1. Canaletas 1, 4-8: Amostras detectadas (FLK, PK15, PK15, PK15, SK6 e ST). Canaletas 2 e 9: Controle da extração. Canaleta 3: Amostra não detectada (PK15) Canaleta 10: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 11: Controle positivo de PCV1. Canaleta 12: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. As setas indicam bandas menos intensas, mas do tamanho esperado para o PCV1.

O sequenciamento foi realizado a partir dos produtos amplificados de quatro amostras escolhidas para confirmar a presença do DNA de PCV1. Os produtos amplificados submetidos ao sequenciamento foram provenientes das amostras MA104 (RO1), PK15 (RO4), PK15 e SK6 (IPE3). Os resultados do sequenciamento dos fragmentos revelaram uma sequência de nucleotídeos correspondente ao gene *Cap* do genoma do PCV1, quando comparadas às depositadas no GenBank. Esses resultados confirmaram a especificidade dos produtos amplificados dessas amostras.

Recentemente, devido à detecção deste agente como contaminante em uma vacina contra a rotavirose humana e na célula utilizada para produção deste produto (Durham, 2010), uma atenção especial foi dada na detecção do PCV1 em produtos biológicos. Diante disso e devido ao fato de que em nosso estudo, o PCV1 apresentou uma ocorrência de 35,2 %, sugere-se além da pesquisa deste agente rotineiramente em linhagens celulares utilizadas para produção de produtos biológicos, como já sugeridos em outros trabalhos, a sua busca em linhagens para fins de diagnóstico, manutenção de estirpes virais e utilizadas em pesquisa.

## **BVDV**

O RNA do BVDV foi detectado em 21 das 88 culturas celulares avaliadas (23,9 %) através das PCR em tempo real e convencional para este agente. Embora ambas as PCR quando padronizadas apresentaram a mesma sensibilidade analítica, verificou-se que das 21 amostras, 13 foram detectadas nas duas RT-PCR, cinco apenas na PCR convencional e três na PCR em tempo real.

As linhagens que apresentaram a detecção do RNA do BVDV foram de origem bovina, suína, humana, coelho, macaco, camundongo, felino, ovelha e equino (Tabelas 11 e 12).

Resultado semelhante foi verificado por Bolin *et al.* (1994) que verificaram a presença do material genético do BVDV em diferentes espécies de células provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC). Audet *et al.* (2000) também verificaram a permissibilidade da cepa NADL do BVDV em diferentes espécies de linhagens celulares utilizadas na produção de produtos biológicos através de uma nested RT-PCR.

A figura 22 apresenta os resultados referentes ao BVDV.

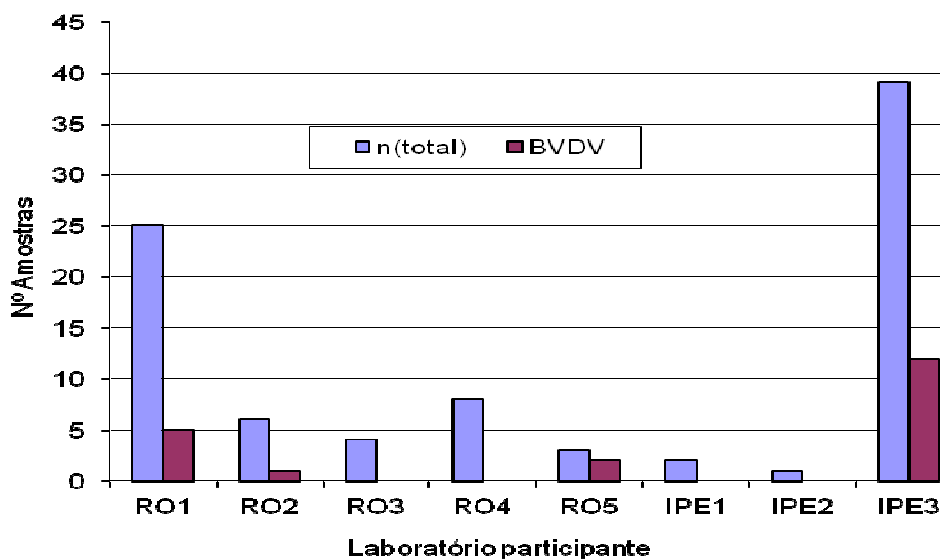


Figura 22: Número de culturas celulares detectadas com genoma de BVDV em relação ao número de amostras processadas por laboratório.

Observa-se a detecção do RNA do BVDV em quatro dos oito laboratórios participantes. Neste caso, a presença do RNA do BVDV encontra-se principalmente em laboratórios que manipulam com frequência este agente com fins de diagnóstico. Cabe ainda ressaltar que a

utilização de insumos como soros bovinos constitui uma das principais fontes de contaminação pelo BVDV.

A figura 23 apresenta a amplificação de algumas amostras de RNA provenientes dos laboratórios RO1 e IPE3 através da PCR convencional para BVDV.

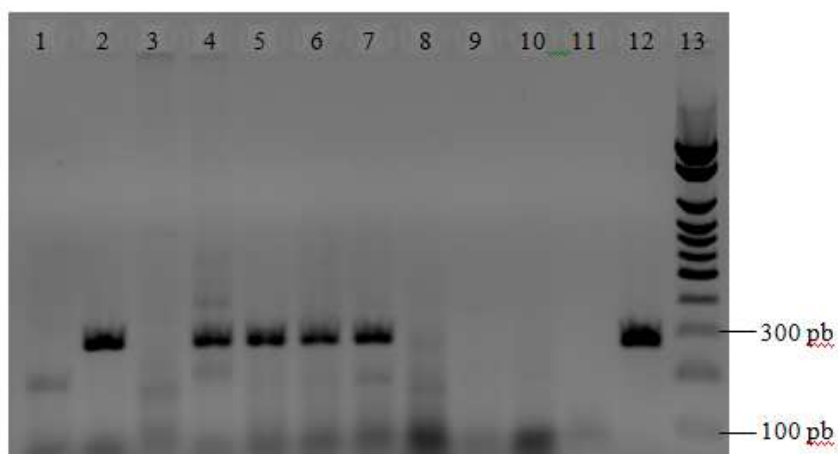


Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos DNA das amostras dos laboratórios RO1 e IPE3 através da PCR para BVDV. Canaletas 1, 8 e 10: Amostras não detectadas (MDBK, INT407 e BT). Canaletas 2 e 4-7: Amostras detectadas (SK6, IBRS2, MDBK, CC 81 e RAW). Canaletas 3 e 9: Controle da extração. Canaleta 11: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 12: Cepa não citopática BVDV (C+). Canaleta 13: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Foi realizado o sequenciamento a partir dos produtos amplificados de sete amostras de RNA detectadas para o BVDV das culturas celulares assim distribuídas: cinco amostras do laboratório IPE3 (EBTr, RK13, MDBK, FLK e CC 81); uma amostra do RO1 (MDBK) e uma do RO2 (MDBK).

Os resultados do sequenciamento dos fragmentos revelaram sequências com menores valores de E-value provenientes do BVDV tipo 2 nas linhagens EBTr e CC81 e, nas demais amostras, as sequências foram provenientes do BVDV tipo 1. Esses resultados estão de acordo com o fato de que a PCR utilizada em nosso estudo é capaz de amplificar a região conservada 5'UTR presente nos dois genótipos do vírus (Ridpath e Bolin, 1998).

Devido ao fato do BVDV como contaminante alterar as características do crescimento celular, bem como levar a resultados falso-positivos quando realizado o diagnóstico deste agente (Wessman e Levings, 1998) e de outros pestivírus, constitui-se de grande importância a pesquisa deste agente em cultivos celulares. Nossos resultados reforçam essa importância, uma vez que a contaminação por este agente esteve presente em quatro dos oito laboratórios que participaram do estudo.

### **PPV**

Conforme visualizado nas tabelas 11 e 12, o PPV foi detectado em 52 das 88 amostras de culturas celulares, correspondendo uma ocorrência de 59,1 %. Os resultados foram confirmados por um segundo analista com a

reextração de algumas amostras de culturas celulares. Esses resultados corroboram com os encontrados por Hallauer *et al.* (1971) que detectaram o parvovírus através do isolamento viral seguido da pesquisa de atividade hemaglutinante em 36 das 43 linhagens celulares avaliadas pertencentes a 19 laboratórios europeus, sendo elas de origem humana, suína e de rato.

Em nosso estudo, o DNA do PPV foi detectado em linhagens celulares de origem bovina, suína, macaco, felino, hamster, rato, camundongo, coelho, ovelha e canino (Tabelas 11 e 12).

A permissibilidade de células de linhagem de origem suína, bovina, felina, humana, de macaco e hamster ao PPV foi estudada por Oraveerakul *et al.* (1992) com o emprego da técnica de imunofluorescência. Esses autores demonstraram que com exceção das células MDCK (canino), as demais foram permissivas à infecção pelo PPV. Resultado semelhante foi obtido por Molitor (1991) ao inocular o PPV em linhagens de origem suína (SK), bovina (EBK e MDBK) e de macaco (VERO) e em seguida detectar por PCR o material genético deste agente em todas essas linhagens. Além disso, esse autor detectou em maior concentração o genoma do PPV na linhagem SK, indicando ser esta célula mais permissível ao PPV que as demais.

A figura 24 apresenta de modo semelhante ao apresentado para micoplasma, PCV1 e BVDV, a distribuição do número de culturas celulares detectadas com DNA do PPV em relação ao número de amostras processadas por laboratório.

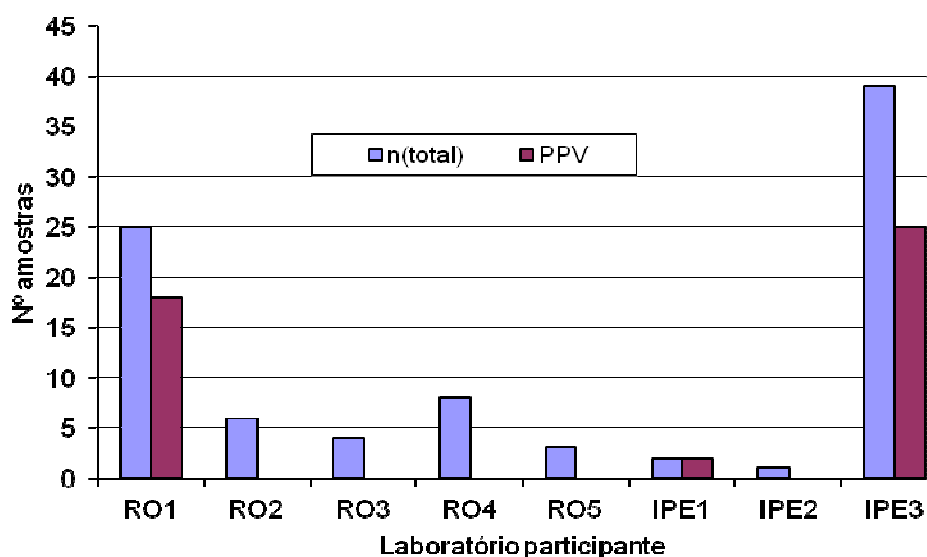


Figura 24: Número de culturas celulares detectadas com DNA de PPV em relação ao número de amostras processadas por laboratório.

Os resultados da figura 24 mostram que a maior parte das amostras detectadas com genoma do PPV pertence a dois laboratórios. De maneira similar às considerações feitas aos resultados do BVDV (figura 22), as células contaminadas pertencem a laboratórios que realizam o diagnóstico da enfermidade. Outro fator considerado importante para explicar a origem das contaminações é aquele relacionado à utilização de insumos contaminados, adquiridos por laboratórios de culturas de células sem a avaliação prévia da presença deste agente. Por último, as culturas celulares pertencentes a esses laboratórios, em alguns casos, foram cedidas em diferentes passagens, o que

provavelmente explica a elevada ocorrência de detecção do PPV.

Segundo Hallauer *et al.* (1971) e Fikrig e Tattersall (1992), o PPV pode ser encontrado em culturas celulares de maneira estável e com caráter de latência. Isto implica provavelmente no fato de que culturas contaminadas com este agente podem passar despercebidas ao serem trocadas entre laboratórios.

Os resultados da PCR para PPV em algumas amostras de DNA das culturas celulares enviadas pelo IPE3 estão apresentados na figura 25.

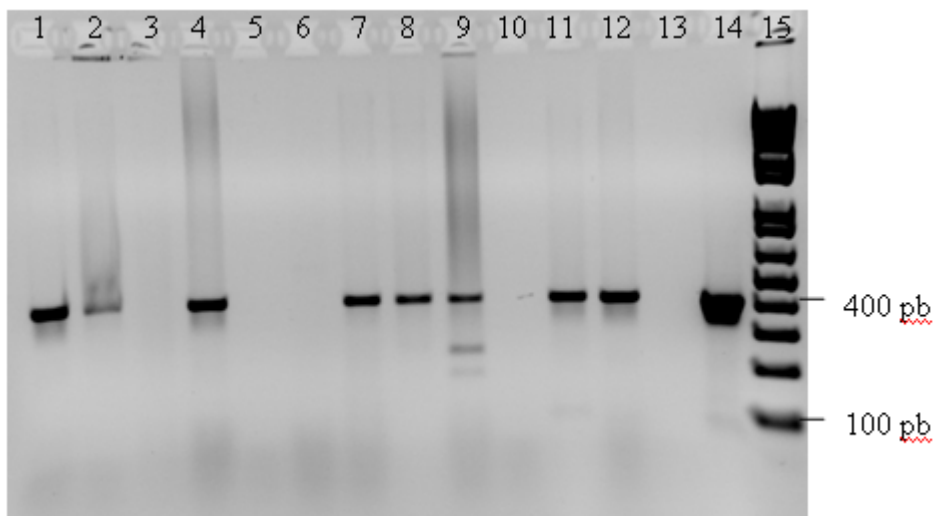


Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação dos DNA das amostras do laboratório IPE3 através da PCR para PPV. Canaletas 1, 2, 4, 7-9, 11 e 12: Amostras detectadas: (SF21, N2A, McCoy, RK13, FLK, MDBK, BHK e BSC). Canaletas 3 e 6: Amostras não detectadas: (EBTr e IBRS2). Canaleta 5: Controle da extração. Canaletas 10 e 13: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR menos DNA. Canaleta 14: Controle positivo PPV cepa NADL. Canaleta 15: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

O sequenciamento foi realizado nos produtos amplificados de seis amostras de DNA detectadas para o PPV, sendo uma amostra de cultura celular do RO1 (CRFK) e cinco amostras do IPE3 (FLK, BHK, MDBK, VERO, PK15). Os resultados do sequenciamento dos fragmentos dessas amostras forneceram seqüências de nucleotídeos, quando comparada com outras disponíveis no GenBank (NCBI), correspondentes ao PPV.

Embora não tenha sido objeto deste estudo, mas devido à expressiva positividade de detecção do DNA do PPV nas culturas celulares testadas, técnicas complementares foram realizadas para reforçar a evidência da presença do PPV: i) transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR) e ii) PCR em tempo real com tecnologia *Prime Time* (sonda). O objetivo da primeira foi avaliar a presença de transcritos de RNA da NS2 do PPV e a

segunda reforçar os resultados encontrados da PCR convencional para o PPV.

A RT-PCR convencional foi padronizada com a utilização de iniciadores desenhados para o *splincing* do transcrito de RNA que produz a NS2. Para a PCR em tempo real com tecnologia *Prime Time* (sonda), os iniciadores foram dirigidos para o gene que codifica para a proteína VP2.

#### RT-PCR para o transcrito da NS2

As culturas celulares escolhidas foram submetidas à extração de RNA pelo Kit Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel, Alemanha) que contém uma etapa de remoção de DNA contaminante. Os RNA extraídos das seguintes amostras: PK15, SK6, BHK21 e VERO foram submetidos a RT-PCR para o PPV. A figura 26 apresenta a amplificação do transcrito pela RT-PCR.



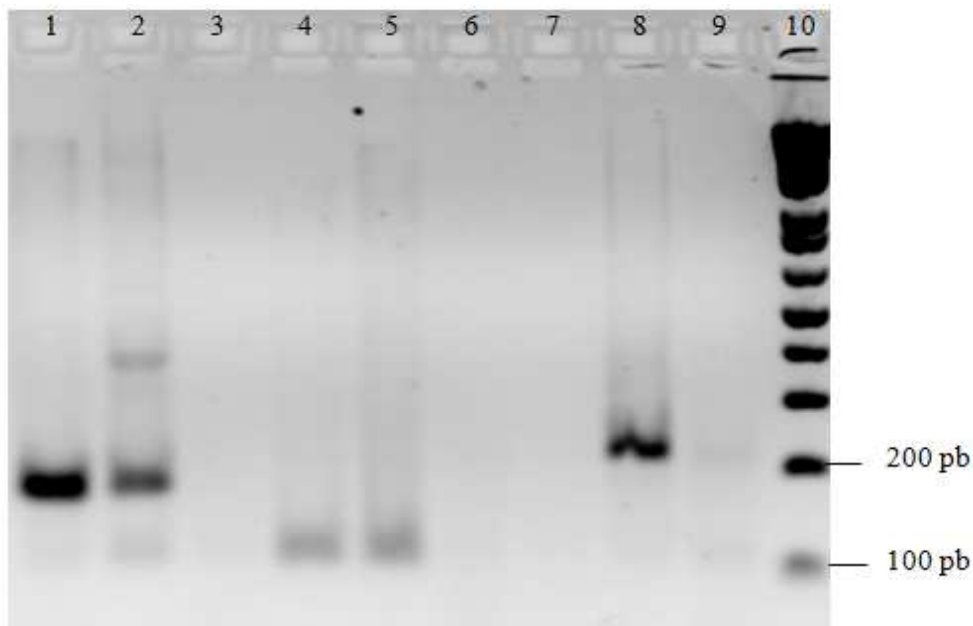


Figura 26- Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a amplificação do transcrito da NS2 do PPV através da RT-PCR em amostras de RNA de algumas culturas celulares. Canaleta 1: RNA PK15. Canaleta 2: RNA SK6. Canaleta 3: RNA controle da extração. Canaleta 4: RNA BHK21. Canaleta 5: RNA VERO. Canaletas 6 e 7: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 8: RNA PPV. Canaleta 9: DNA PPV. Canaleta 10: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Conforme visualizado na figura 26, foi possível detectar o produto da amplificação do transcrito da NS2, correspondente a 174 pb, apenas nas linhagens de origem suína (PK15 e SK6). Esses resultados sugerem que o transcrito do PPV que codifica para esta proteína não estrutural provavelmente é expresso somente em células permissivas como as de origem suína (SK6, PK15) ou em quantidades maiores do que as produzidas em outras células (VERO, BHK 21), de modo que a RT-PCR não foi sensível o suficiente para detectá-lo nas outras linhagens. Além disso, a especificidade do produto amplificado a partir da RT-PCR da célula SK6 foi confirmada pelo sequenciamento que revelou ser esse fragmento proveniente do transcrito da NS2 do PPV, indicando que este estava realmente em *splicing*.

Esse achado corrobora com o encontrado por Oraveerakul *et al.* (1992) que através da técnica Northern Blot, utilizando sondas de

oligonucleotídeos derivadas de regiões que codificam proteínas estruturais e não estruturais do PPV, detectaram os transcritos de RNA mensageiro a partir das regiões que codificam proteínas estruturais no RNA extraído das linhagens ST (considerada por esses autores como permissiva) e MDCK (não permissiva). Ainda como resultado, os transcritos de proteína não estrutural do PPV foram detectados significativamente apenas nas células ST. Diante disso, os autores inferiram que existem restrições na replicação do PPV em células não permissivas como a MDCK, relacionadas às etapas da transcrição viral, fato este verificado pela ausência ou quantidade insuficiente de detecção de transcritos responsáveis pela codificação de proteínas não estruturais essenciais na replicação do PPV.

Devido ao fato da proteína não estrutural NS2 ser produzida a partir do *splicing*

alternativo da proteína não estrutural NS1 (Bergeron *et al.*, 1993), realizamos novamente essa técnica, porém como produto o DNA das linhagens VERO e SK6,

em vez de RNA. A figura 27 apresenta a eletroforese em gel de agarose da amplificação através da PCR a partir do DNA dessas linhagens.

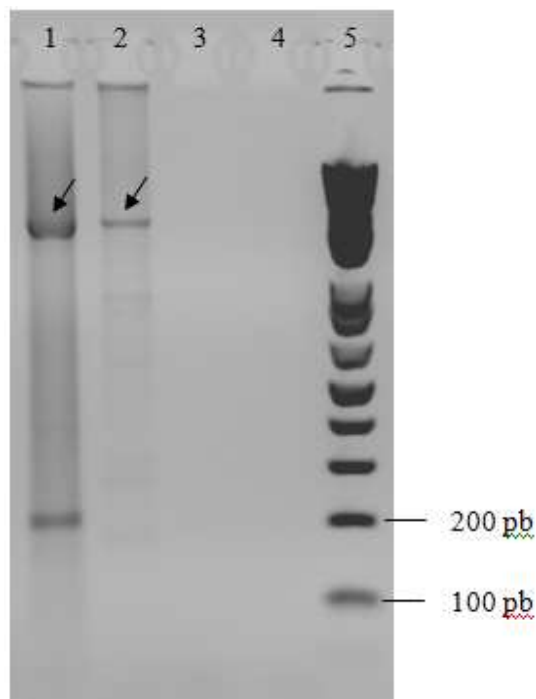


Figura 27- Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando o produto da amplificação da PCR realizada a partir do DNA de duas culturas celulares. Canaleta 1: DNA SK6 Canaleta 2: DNA VERO. Canaletas 3 e 4: Controle negativo contendo somente reagentes da PCR. Canaleta 5: Padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Como anteriormente citado, o transcrito para NS2 não foi detectado pela RT-PCR na amostra de RNA da célula VERO. Os resultados presentes na figura 27 indicam a presença de bandas superiores presente no DNA das células VERO e SK6, visualizado pelas bandas indicadas pelas setas, indicando ser estas provenientes do gene da NS1 conforme evidenciado pelo programa Primer Blast (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Porém, somente na canaleta do produto da PCR com o DNA da SK6, pode-se ainda observar um produto de aproximadamente 200 pb, provavelmente relacionado com o gene da NS2, tamanho este semelhante ao

encontrado quando a PCR foi realizada com material extraído para RNA.

#### PCR em tempo real *Prime Time* (sonda) para o PPV

A PCR em tempo real padronizada para detecção do genoma da VP2 do PPV foi também realizada com o objetivo de reforçar os resultados encontrados da PCR convencional para o PPV. Esta PCR em tempo real se baseia na tecnologia de sonda, entretanto possui como diferencial a presença dos oligonucleotídeos (iniciadores e sonda) sintetizados em um mesmo tubo. Foram escolhidas algumas amostras de

DNA de culturas celulares presentes neste estudo e submetidas a essa PCR.

culturas celulares, aleatoriamente escolhidas que apresentaram detecção do DNA de PPV na PCR convencional.

A figura 28 apresenta a curva de amplificação por PCR em tempo real de

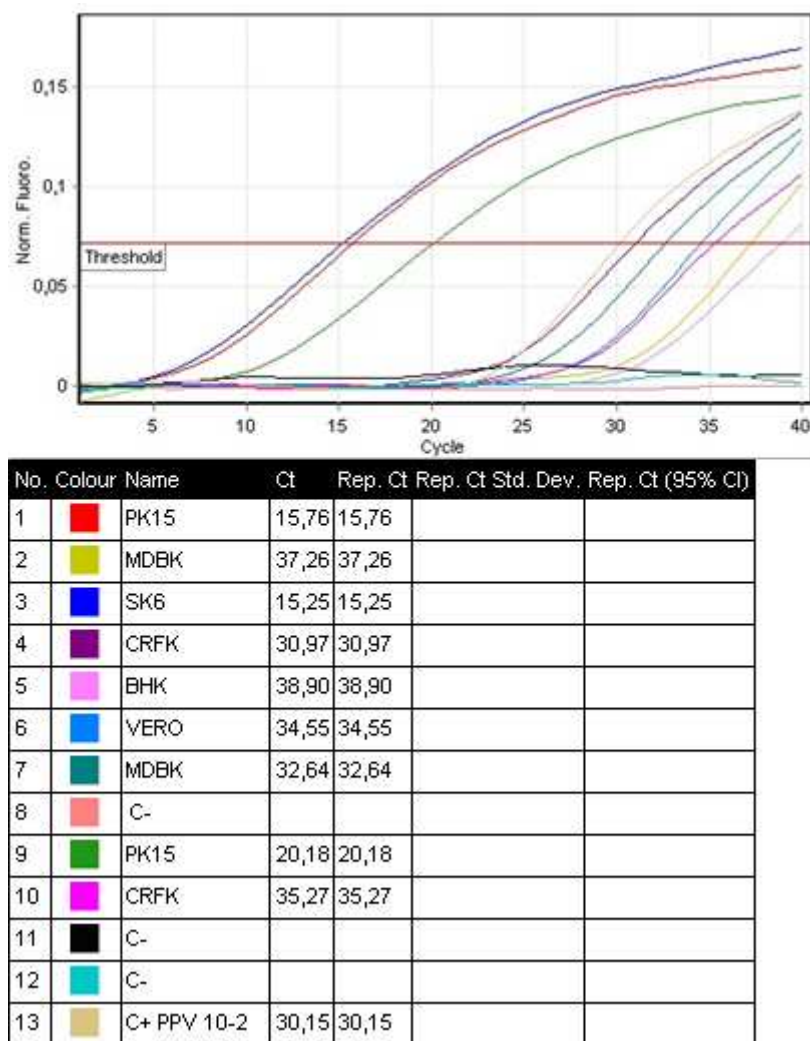


Figura 28 – Curva de amplificação do gene da VP2 do PPV obtida através da PCR em tempo real *Prime Time*. Aparelho Rotor-gene 3000 (Corbett Research, Austrália).

Os resultados da figura 28 indicam a presença do genoma de PPV nas amostras de cultura celular, confirmando o resultado obtido na PCR convencional. Nota-se que os valores de Ct são menores nas células de origem suína (PK15 e SK6), indicando que o DNA deste agente está presente

nessas linhagens em maior quantidade que nas demais.

### BLV

As tabelas 11 e 12 indicam que o provírus do BLV foi detectado em três das 88 amostras analisadas (3,4%). Como

visualizado nestas tabelas, a detecção do BLV foi restrita ao laboratório IPE3. Duas das três amostras detectadas para o BLV são de origens de ovinos (FLK), sendo esta linhagem utilizada para pesquisa e produção de antígeno para o BLV. Essas culturas estavam persistentemente infectadas com o BLV. Já a RAW que é uma linhagem de células leucêmicas de macrófago/monócito de camundongo também apresentou o provírus deste agente.

Doménech *et al.* (2000) estudaram a transmissão do BLV a partir de células persistentemente infectadas para linhagens de células de macrófago/monócito e concluíram que estas podem ser infectadas pelo BLV, uma vez que são capazes de expressar proteínas do vírus quando verificada pela técnica de Western Blot.

O sequenciamento foi realizado nos produtos amplificados das duas amostras FLK e da RAW e os resultados dos fragmentos sequenciados revelaram ser provenientes do gene *env* do BLV, confirmando assim a especificidade desses produtos amplificados.

Através de evidências experimentais como a hibridização *in situ*, citometria de fluxo e RT-PCR, Gillet *et al.* (2007) propuseram um modelo postulando que o BLV é latente em diversas células. Chama-se atenção ainda ao fato de que o BLV é citado como possível contaminante de soros de origem bovina utilizado na produção de produtos biológicos por órgãos regulamentadores como o FDA e em trabalhos presentes na literatura (Characterization..., 2010; Castle e Robertson; 1998). Do mesmo modo, Eloit (1997) citado por Merten (2002) descreve o BLV como um dos agentes virais a serem testados nesses insumos.

Diante desses fatores, acredita-se ser interessante a pesquisa do genoma deste agente em linhagens celulares e seus insumos.

#### Insumos: Soros e tripsinas

Os soros e tripsinas de diferentes lotes e fabricantes avaliados frente aos contaminantes propostos apresentaram os resultados descritos nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Tabela 12 - Resultados encontrados por agente contaminante nas amostras de soros dos laboratórios RO1, RO2, RO3, RO5 e IPE3.

Laboratórios	Soro	Resultado de análises por agente contaminante				
		Micoplasma	PCV1	BLV	PPV	BVDV
RO1	SB1	-	-	-	-	-
	SB2	-	-	-	-	-
	SB3	-	-	-	-	+
	SB4	-	-	-	-	+
	SB5	-	-	-	-	-
	SB6	-	-	-	-	-
	SB7	-	-	-	-	-
RO2	SB8	-	-	-	-	-
	SB9	-	-	-	-	-
RO3	SB10	-	-	-	-	-
RO5	SB11	-	-	-	-	-
IPE3	SB12	-	-	-	-	-
	SB13	-	-	-	-	-

Tabela 13- Resultados encontrados por agente contaminante nas amostras de tripsinas dos laboratórios RO1, RO2, RO3, RO5 e IPE3

Laboratórios	Tripsina	Resultado de análises por agente contaminante				
		Micoplasma	PCV1	BLV	PPV	BVDV
RO1	T1	-	-	-	-	-
	T2	-	-	-	-	-
	T3	-	-	-	-	-
RO2	T4	-	-	-	-	-
	T5	-	+	-	-	-
RO3	T6	-	-	-	-	-
RO5	T7	-	+	-	+	-
IPE3	T8	-	-	-	-	-
	T9	-	-	-	-	-
	T10	-	-	-	-	-

Os resultados nas tabelas 12 e 13 indicam que o genoma do BVDV, PCV1 e PPV foi detectado nas amostras de insumos avaliados.

O BVDV foi detectado em duas das 13 amostras de soros bovinos avaliadas, sendo que essas duas amostras eram provenientes do laboratório RO1 e pertencentes a fabricantes diferentes.

O DNA do PCV1 e PPV foi identificado em duas das 10 amostras de tripsina avaliadas, sendo que na tripsina do laboratório RO5 foram detectados os dois agentes e no laboratório RO2 apenas o do PCV1. Isto indica que esta amostra contendo esses dois contaminantes pode ser capaz de introduzir simultaneamente o PPV e PCV1.

Observa-se que o BVDV e o PCV1 encontrados nos insumos de determinados laboratórios foram também detectados nas amostras de culturas celulares enviadas pelos mesmos. Esses insumos, portanto, podem ser uma provável fonte de introdução destes agentes nas culturas celulares contaminadas destes laboratórios.

Vilcek (2001) também identificaram os pestivírus como contaminantes em soro

fetal bovino e recentemente, um Pestivírus atípico, denominado D32/00\_‘HoBi’ foi identificado em amostra de soro fetal bovino de origem brasileira (Schirrmeyer *et al.*, 2004).

A detecção de PPV em tripsina em nosso estudo está de acordo com as citações da literatura de que o PPV é um contaminante celular (Marcus-Sekura *et al.*, 2011). Estes autores apontam ainda que alguns vírus podem ser inativados pela atividade enzimática da tripsina, entretanto o PPV é resistente a esta atividade.

Os laboratórios que se dispuseram a contribuir com este estudo enviando as amostras de linhagens celulares apresentaram em comum a ocorrência de Micoplasma (*Mollicutes*) e PCV1. Três laboratórios de redes oficiais (RO1, RO2 e RO5) e um laboratório de ensino e pesquisa, IPE3, apresentaram a ocorrência de BVDV em suas linhagens celulares. A ocorrência de PPV foi verificada em amostras dos laboratórios RO1, IPE1 e IPE3. Já a ocorrência de BLV foi restrita ao laboratório IPE3. A distribuição dos agentes propostos neste estudo detectados no total de amostras analisadas está apresentada na figura 29.

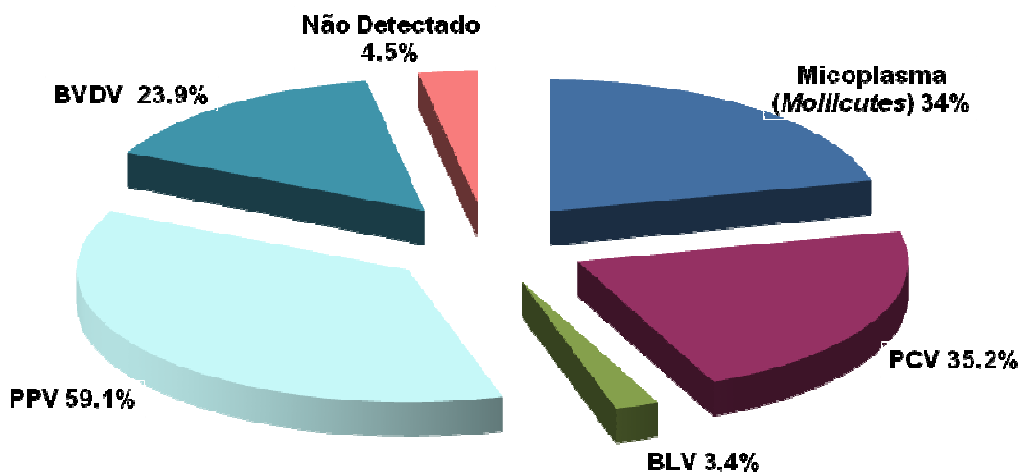


Figura 29 - Distribuição dos agentes propostos neste estudo detectados no total de amostras analisadas.

Esses resultados demonstram a importância da realização regular de ensaios de detecção para estes agentes em culturas celulares, em especial na utilização da PCR como ferramenta eficaz para essa detecção.

No presente estudo, é importante ressaltar que na etapa de aquisição das amostras, vários usuários rejeitaram a proposta de envio de suas linhagens celulares. Esse ocorrido foi também evidenciado por Miyaki *et al.* (1989) quando tentavam adquirir amostras de culturas celulares de diferentes laboratórios para testar frente a micoplasmas. Esses autores conseguiram um número significativamente pequeno em relação ao período de aquisição das amostras, sendo que muitos participantes não se interessaram em ter conhecimento dos resultados.

Em relação aos insumos analisados, foi detectada a presença do genoma do BVDV, PCV1 e PPV. Chama-se atenção para o potencial de contaminação destes materiais quando da utilização dos mesmos em procedimentos com culturas celulares livres de contaminante. Além disso, esses insumos, em geral, são adquiridos em quantidades suficientes para trabalhos de longos períodos e uma vez estabelecida

uma contaminação, esta pode ser propagada entre os laboratórios através do câmbio dessas linhagens e dentro de um laboratório através de procedimentos que objetivam a manutenção das mesmas, como prática de repiques e congelamento.

Recentemente, foi detectada a presença de PCV1 em uma vacina humana contra a rotavirose, apesar de existir legislações previstas por órgãos regulamentadores como FDA, OMS e OIE que recomendam o controle de contaminantes com a utilização de vários métodos. Dentre os métodos citados para a detecção de agentes contaminantes, encontram-se o isolamento viral, a pesquisa de atividade hemaglutinante, de hemadsorção, sorologia e microscopia eletrônica. No entanto, todos eles são considerados demorados ou requerem a utilização de animais. Nesse sentido, as PCR padronizadas neste estudo contribuíram para o estudo da detecção de contaminantes e foram consideradas de forma analítica sensíveis, específicas e de rápida execução como indicado por órgãos regulamentadores, recomendando-se, pois, suas aplicações em caráter de rotina para laboratórios que trabalham com culturas celulares e seus insumos.

## 5 CONCLUSÕES

1. As PCR padronizadas neste estudo constituíram-se em uma ferramenta rápida, sensível e específica, de forma analítica, na pesquisa de contaminantes celulares.
2. Foi evidenciada a presença de contaminação por micoplasma, PCV1, PPV, BVDV e BLV nas amostras de células provenientes de diferentes laboratórios;
3. Com exceção do BLV, os demais contaminantes apresentaram uma considerável frequência de distribuição nos laboratórios;
4. Nas amostras de soros e tripsinas, foi encontrada a presença do material genético de PCV1, PPV e BVDV.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 55 de dez. 2010. *Diário Oficial*, Brasília, 17 dez. 2010. Seção 1, p. 119.

ALLAN, G.M.; McNEILLY, F.; CASSIDY, J. P. *et al.* Pathogenesis of porcine circovirus; experimental infections of colostrum deprived piglets and examination of pig foetal material. *Vet. Microbiol.*, v. 44, n. 1, p. 49-64, 1995.

ALLAN, G.; MEEHAN, B.; TODD, D. *et al.* Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Veterinary Record.*, v. 142, n. 17, p. 467-468, 1998.

ALVES, E. A.; GUIMARAES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Orgs.). *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV/ FIOCRUZ, 2010. v. 2, p. 215-253.

AUDET, S. A.; CRIM, R. L.; BEELER, J. Evaluation of vaccines, interferons and cell substrates for pestivirus contamination. *Biologicals*. v. 28, n. 1, p. 41-46, 2000.

AYRAL, A. M.; CLARKSON, S.; CHEESEMAN, M. *et al.* A panel of optimized primers and positive-control DNAs for PCR detection of common biological contaminants in mouse cell lines and tissue samples. *Lab. Anim.*, v. 35, n. 8, p. 31-36, 2006.

BAKER, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. N. Am.*, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BARILE, M.F.; HOPPS, H.E.; GRABOWSKI, M.W. *et al.* The identification and sources of mycoplasmas isolated from contaminated cell cultures. *AnnNY Acad Sci*, v. 225, p. 251-264, 1973.

BAUER, B. A.; BESCH-WILLIFORD, C. L.; RILEY, L. K. Comparison of the mouse antibody production (MAP) assay and polymerase chain reaction (PCR) assays for the detection of viral contaminants. *Biologicals.*, v. 32, n. 4, p. 177-182, 2004.

BAYLIS, S. A.; FINSTERBUSCH, T.; BANNERT, N. *et al.* Analysis of porcine circovirus type 1 detected in Rotarix vaccine. *Vaccine.*, v. 29, n. 4, p. 690-697, 2011.

BERGERON, J.; MENEZES, J.; TIJSSEN, P. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology*, v. 197, n.1, p. 86-98, 1993.

BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, v. 83, n. 1, p. 1-10, 2001.

BIELANSKI, A.; ALGIRE, J.; LALONDE, A. *et al.* Transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. *Theriogenology*, v. 71, n. 3, p. 499-508, 2009.

- BIOSSEGURANÇA em laboratórios biomédicos e de microbiologia / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3. ed. em português rev. e atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 290 p.
- BOLIN, S. R.; MATTHEWS, P. J.; RIDPATH, J. F. *et al.* Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 3, n. 3, p. 199–203, 1991.
- BOLIN, S. R.; RIDPATH, J. F.; BLACK, J. *et al.* Survey of cell lines in the American Type Culture Collection for bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol. Methods.*, v. 48, n. 2-3, p. 211-221, 1994.
- BOOLSKE, G. Survey of mycoplasma in cell cultures and a comparison of detection methods. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.*, v. 269, n. 3, p. 331-340, 1990.
- BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. *Virology: a laboratory manual*. San Diego: Academic Press, 1992. 250p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.7 de 10 de março de 2005. Aprovar o regulamento técnico para a produção, o controle e o uso de vacinas e diluentes para uso na avicultura. *Diário Oficial*, Brasília, 20 mar. 2006. p. 4.
- BRÎNZEU, D. G. T.; FEIER, V.; HERBECK, R. *et al.* Microbial and fungal contamination of keratinocyte and fibroblast cell cultures. *J. Exp. Med. Surg. Res.*, v. 15, n. 3, p. 123-128, 2008.
- BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: UFSM., 2007. Cap.3, p.61-86.
- BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H. *et al.* Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex*, v. 27. n. 1, p. 53-62, 2010.
- BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.*, v. 83, n.1, p. 1-10, 2001.
- CAMARGOS, M. F.; PEREDA, A.; STANCEK, D. *et al.* Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine Leukemia Virus. *Virus Genes*, v. 34, n. 3, p. 343-350, 2007.
- CAMARGOS, M. F.; OLIVEIRA, A. M.; FONSECA JUNIOR, A. A. *et al.* Aplicação da reação em cadeia da polimerase para detecção de *Mycoplasma spp* na rotina de cultivos celulares. *Ciênc. Anim. Bras.*, v. 9, n.1, p. 786-790, 2008.
- CHARACTERIZATION and qualification of cell substrates and other biological materials used in the production of viral vaccines for infectious disease indications. Rockville, MD: FDA/ US Department of Health and Human Services. 2010.
- COBO, F.; STACEY, G. N.; HUNT, C. *et al.* Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 68, n. 4, p. 456-466, 2005.
- CODE of Federal Regulations 9CFR. Washington, EUA: USDA, 2012.
- COLLETT, M. S.; LARSON, R.; GOLD, C. *et al.* Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, v. 165, p. 191-199, 1988.
- COMBES, R. D. The use of human cells in biomedical research and testing. *Altern. Lab. Anim.*, v. 32, n.1, p. 43-49, 2004.



- CORIELL LL. Methods of prevention of bacterial, fungal, and other contaminations. In: FOGH, J. (Ed.) *Contamination of tissue culture*. London: Academic Press, 1973, p. 30-48.
- CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; CASTRO, A.M.M.G. *et al.* Genetic Characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5'UTR region. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 16, n. 4, p. 211-216, 2006.
- DOMÉNECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L. *et al.* In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J. Gen. Virol.*, v. 81, n. 1, p. 109-118, 2000.
- DONIS, R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract.*, v. 11, n. 3, p. 393-423, 1995.
- D'SOUZA, V.; SUMMERS, M. F. How retroviruses select their genomes. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.3, n. 8, p. 643-655, 2005.
- DUBE, S.; BACHMAN, S.; SPICER, T. *et al.* Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world. *J. Gen. Virol.*, v.78, n. 6, p. 1389-1398, 1997.
- DURHAM, M. S. Vaccine contamination prompts safety review. *Nat. Med.* v. 16, n. 5, 2010.
- DVORAKOVA, H.; VALICEK, L.; REICHELOVA, M. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. *Vet. Med.*, v.50, n. 6, p. 262-268, 2005.
- ELOIT, M. Risques virologiques associés aux matières premières extraites de tissus animaux utilisées dans la fabrication des médicaments. *Virologie*, v.1, n. 5, p. 413-422, 1997.
- FALCONE, E.; TOLLIS, M.; CONTI, G. Bovine viral diarrhoea disease associated with a contaminated vaccine. *Vaccine*, v. 18, n. 5-6, p. 387-388, 1999.
- FIGUEIREDO, G.S.; REIS, A. C. M.; CASTRO, A. S. *et al.* Reação de sequenciamento de DNA e purificação: protocolos otimizados. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. (Circular técnica, 22).
- FIKRIG, M. K.; TATTERSALL, P. Latent parvoviral infection of continuous cell lines. *Dev. Biol. Stand.*, v. 76, p. 285-293, 1992.
- FLORES, E. F. *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 888 p.
- FONSECA Jr, A. A.; CAMARGOS, M. F.; DE OLIVEIRA, A. M. *et al.* Molecular epidemiology of Brazilian pseudorabies viral isolates. *Vet. Microbiol.*, v.141, n. 3-4, p. 238-245, 2010.
- FRANCKY, R. I .B.; FAUQUET, C. M.; KNUDSON, D. L. *et al.* Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on the taxonomy of viruses. *Arch. Virol.* v. 2, p. 223-233, 1991.
- FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3.ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 486p.
- FRESHNEY, R. I. Basic principles of cell culture. In: VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FRESHNEY, R.I. (Eds), Culture of cells for tissue engineering. New Jersey: Wiley-Liss, 2006. p. 1-22.
- FRESHNEY, R. I. Cell line provenance. *Cytotechnology*, v. 39, n.2, p. 55-67, 2002.
- FRIEDMAN, M.; FRIEDLAND, G.W. As dez maiores descobertas da medicina. In: *Ross Harrison e a cultura de tecidos*. ed. Companhia das Letras, 2006, Cap. 7, p. 165-188.

- GIBSON, U. E.; HEID C. A.; WILLIAMS P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, v. 6, n. 10, p. 995-1001, 1996.
- GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M. *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, v. 4, n.18, p. 1-32, 2007.
- GOPALKRISHNA, V.; VERMA, H.; KUMBHAR, N.S. *et al.* Detection of mycoplasma species in cell culture by PCR and RFLP based method: effect of BM-cyclin to cure infections. *Indian J. Med. Microbiol.*, v. 25, n. 4, p. 364-368, 2007.
- GRAVES, D. C.; FERRER, J.F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res.*, v. 36, p. 4152-4159, 1976.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, v. 41, n. 41, p. 95-98, 1999.
- HALLAUER, C.; KRONAUER, G.; SIEGL G. Parvoviruses as contaminants of permanent human cell lines I: virus isolations from 1960-1970. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, v. 35, n. 1, p. 80-90, 1971.
- HALLAUER, C.; SIEGL, G.; KRONAUER, G. Parvoviruses as contaminants of permanent human cell lines. 3. Biological properties of the isolated viruses. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, v. 38, n. 4, p. 366-382, 1972.
- HAY, R.J. Operator-induced contamination in cell culture systems. *Dev Biol Stand*, v. 75, p. 193-204, 1991.
- HAY, R. J.; MACY, M. L.; CHEN. T. R. Mycoplasma infection of cultured cells. *Nature*, v. 339, p. 487-488, 1989.
- HERRMANN, R. G. O.; HLMANN, H. W. H.; REGULA, J. T. *et al.* Mycoplasmas, the smallest known bacteria. In: *MICROBIAL evolution and infection*, Reinbeck, Germany: Goebel UB e Ruf BR. Einhorn-Press Verlag, 1999, p. 71-79.
- JERN, P.; COFFIN, J. M. Effects of retroviruses on host genome function. *Annu. Ver. Genet.*, v. 42, p. 709-732, 2008.
- JOHNSON, R.; KANEENE J.B. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.*, v. 62, n. 4, p. 287-312, 1992.
- JONES, S.; CHEN, W. D.; PARMIGIANI, G. *et al.* Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl. Acad. Sci. EUA*, v. 105, n.11, p. 4283-4288, 2008.
- JONES, M. S.; KAPOOR, A.; LUKASHOV, V. V. *et al.* New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J. Virol.*, v. 79, n. 13, p. 8230-8236, 2005.
- KERKHOFS, P.; HEREMANS, H.; BURNY, A. *et al.* In vitro and in vivo oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J. Virol.*, v. 72, n. 3, p. 2554-2559, 1998.
- KIM, J.H.; LYOO, Y.S. Genetic characterization of porcine circovirus-2 field isolates from PMWS pigs. *J. Vet. Sci.*, v. 3, n. 1, p. 31-39, 2002.
- KULCSAR, G.; FARSANG, A.; SOOS, T. Testing for viral contaminants of veterinary vaccines in Hungary. *Biologicals*, v. 38, n. 3, p. 346-349, 2010.
- KUMAR, D.; BEACH, N. M.; MENG, X. J. *et al.* Use of PCR-based assays for the detection of the adventitious agent porcine circovirus type 1 (PCV1) in vaccines, and for confirming the identity of cell substrates and viruses used in vaccine production. *J. Virol. Methods.*, v. 179, n. 1, p. 201-211, 2012.

- KUPPEVELD, F. J. M.; JOHANSSON, K. E.; GALAMA, J. M. D. *et al.* Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 60, n.1, p.149-152, 1994.
- LANDIS, J.; KOCH, G. G. The measurements of agreement for categorical data. *Biometrics*, v.33, n.3, p.159-179, 1977.
- LANGDON, S. P. Cell culture contamination an overview. In: LANGDON, S.P. (Ed.). *Cancer cell culture: methods and protocols*. Totowa, N.J.: S.P. Langdon © Humana Press Inc, 2004, v. 88, Cap.6, p. 309-317.
- LANGDON, S.P. *Mammalian cell culture*. In: TOTOWA N.J.; WALKER, J.M.; RAPLEY, R. (Eds.). *Molecular biometrics handbook*, 2.ed. Clifton, New Jersey: Humana Press, 2008. Cap. 49, p. 859-872.
- LEVINGS, R. L.; WESSMAN, S. J. Bovine viral diarrhea virus contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccine. *Dev. Biol. Stand.*, v. 75, p. 177-181, 1991.
- LICURSI, M.; INOSHIMA, Y.; WU, D. *et al.* Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet. Microbiol.*, v. 96, n. 1. p. 17-23, 2003.
- LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N. *et al.* Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, v. 385, n. 2, p. 351-357, 2009.
- MA, H.; SHAHEDUZZAMAN, S.; WILLIAMS, D. K. *et al.* Investigations of porcine circovirus type 1 (PCV1) in vaccine-related and other cell lines. *Vaccine*, v. 29, n. 46, p. 8429-8437, 2011.
- MAHY, B.W.J. *The dictionary of virology*. M.ed.Atlanta: Division of Emerging Infections and Surveillance Services Centers for Disease Control and Prevention, 2009.
- MAKOSCHEY, B.; VAN GELDER, P. T.; KEIJSERS, V. *et al.* Bovine viral diarrhea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals*. v. 31, n. 3, p. 203-208, 2003.
- MAMOUN, R. Z.; MORISSON, M.; REBEYROTTE, N. *et al.* Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J. Virol.* v. 64, n. 9, p. 4180-4188, 1990.
- MANILOFF J. Review: the minimal cell genome: "on being the right size". *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, v. 93, n. 19, p. 10004-10006, 1996.
- MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris, França: OIE, 2008.
- MARCUS-SEKURA ,C.; RICHARDSON, J. C.; HARSTON, R. K. *et al.* Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. *Biologicals.*, v. 39, n. 6, p. 359-369, 2011.
- MASTERS, J. R. False cell lines: the problem and a solution. *Cytotechnology*, v. 39, n. 2, p. 69-74, 2002.
- McCLENAHAN, S. D.; KRAUSE, P. R.; UHLENHAUT, C. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines. *Vaccine*, v.29, n. 29-30, p. 4745-4753, 2011.
- McGARRITY, G. J. Detection of mycoplasmal infection of cell cultures. In: MARAMOROSCH, K. (ed) *Advances in cell cultures*. New York: Academic, 1982, v. 2, p. 99-131
- McGARRITY, G. J.; KOTANI, H. Cell culture mycoplasmas. In: RAZIN, S.; BARILE, M. F. (Eds.). *The mycoplasmas Mycoplasma pathogenicity*. New York: Academic Press, 1985. v. 4, p. 353-390.

- McGARRITY, G. J.; KOTANI, H.; BUTLER, G. H. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; BASEMAN, J. B. (Eds.) *et al. Mycoplasmas—molecular biology and pathogenesis*. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 445–454.
- MEEHAN, B.M.; MCNEILLY, F.; TODD, D. *et al.* Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *J. Gen. Virol.*, v. 79., p. 2171–2179, 1998.
- MERTEN, O. W. Virus contaminations of cell cultures: a biotechnological view. *Cytotechnology*, v. 39, n. 2, p. 91-116, 2002.
- MIRJALILI, A.; PARMOOR, E.; MORADI BIDHENDI, S. *et al.* Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. *Biologicals*, v. 33, n. 2, p. 81-85, 2005.
- MIYAKI, C. PRAL, M. M.; GALLINA, N. M. F. *et al.* Micoplasma como contaminante de culturas celulares mantidas em laboratórios de instituições particulares e oficiais. *Rev. Saúde Pública*, v.23, n.1, p. 39-44, 1989.
- MOLITOR, T. W.; JOO, H. S.; COLLETT, M. S. Porcine parvovirus DNA: characterization of genomic and replicative form DNA of two virus isolates. *Virology*, v. 137, p. 241-254, 1984.
- MOLITOR, T. W.; ORAVEERAKUL, K.; ZHANG, Q. Q. *et al.* Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *J. Virol. Methods.*, v. 32, n. 2-3, p. 201-211, 1991.
- NAKAI, N.; KAWAGUCHI, C.; NAWA, K. *et al.* Detection and elimination of contaminating microorganisms in transplantable tumors and cell lines. *Exp. Anim.*, v. 49, n. 4, p. 309-313, 2000.
- NASCIMENTO, J.A.F.B. *Análise filogenética do circovírus suíno tipo 2 no Brasil*. 2009. 127f. Tese (Doutorado)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- OLSON, L. D.; BARILE, M. F. Mycoplasma infection of cell cultures: Isolation and detection. *Methods Cell Sci.*, v.11, n.3, p.175-179, 1988.
- ORAVEERAKUL, K.; CHOI, C. S.; MOLITOR, T. W. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J. Virol.*, v. 66, n. 2, p. 715-722, 1992.
- PASTORET, P. P. Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals*, v. 38, n. 3, p. 332-334, 2010.
- PASTORET, P. P.; BLANCOU, J.; VANNIER, P. *et al.* Veterinary vaccinology. Amsterdam: Elsevier; 1997.
- PELT-VERKUIL, E. V.; BELKUM, A. V.; HAYS, J. P. *Principles and technical aspects of PCR amplification*, Heidelberg: Springer. 2008. 325p.
- PEREDELTCOUK, M.; DAVID, S. A.; BHATTACHARYA, B. *et al.* Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. *J. Appl. Microbiol.*, v. 110, n. 1, p. 54-60, 2011.
- PETRICCIANI, J.; SHEETS, R. An overview of animal cell substrates for biological products. *Biologicals*, v. 36, n. 6, p. 359-362, 2008.
- PLAVSIC, Z.M. Gamma irradiation of circoviruses in fetal bovine serum. In: VIRAL CLEARANCE FORUM. Bethesda, 1-3 Oct., 2001.
- RIDPATH, J. F. Sequence diversity and genotyping. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM. *Bovine Viral Diarrhea Virus: a 50 years Review*. Ithaca, Cornell University, 1996, p. 39-42.
- POLAK-VOGELZANG, A. A.; ANGULO, A. F.; BRUGMAN, J. *et al.* Survival of Mycoplasma hyorhinis in trypsin solutions. *Biologicals*, v. 18, n. 2, p. 97-101, 1990.

- QUINTANA, J.; SEGALÉS, J.; CALSAMIGLIA, M. *et al.* Detection of porcine circovirus type 1 in commercial pig vaccines using polymerase chain reaction. *Vet. J.*, v. 171, n. 3, p. 570-573, 2006.
- RÁNZ, A. I.; MANCLUS, J. J.; DIAZ-ARCOCA, E. *et al.* Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. *J. Gen. Virol.*, v. 70, n. 10, p. 2541-2553, 1989.
- RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, n. 4, p. 1094-1156, 1998.
- RIDPATH, J. F. Sequence diversity and genotyping. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM. *Bovine Viral Diarrhea Virus: a 50 years Review*. Ithaca, Cornell University, 1996, p. 39-42.
- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R. Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhoea virus (BVDV) by PCR. *Mol. Cell. Probes*, v. 12, n. 2, p. 101-106, 1998.
- RIDPATH, J. F.; MENGELING, W. L. Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res.*, v. 10, n. 1, p. 17-28, 1988.
- ROLA, M.; KUZMAK, J. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. *J Virol Methods.*, v. 99, n.1-2, p. 33-40, 2002.
- ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.*, v. 83, n. 2, p. 417-432, 2003.
- RYAN, J.A. *Introduction to animal cell culture*. Chelmsford St Lowell: Corning Incorporated, 2003.
- RYAN, J.A. Understanding and managing cell culture contamination. 1994. Corning Technical bulletin life science. Disponível em: <<http://catalog2.corning.com/Lifesciences/media/pdf/cccontamination.pdf>>. Acessado em: Novembro de 2011.
- SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; OHISHI, K. *et al.* Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *EMBO. J.*, v. 3, n. 13, p. 3231-3237, 1984.
- SASAKI, T.; HARASAWA, R.; SHINTANI, M. *et al.* Application of PCR for detection of mycoplasma DNA and pestivirus RNA in human live viral vaccines. *Biologicals*, v. 24, n. 4, p. 371-375, 1996.
- SCHIFF, L. J. Review: production, characterization, and testing of banked mammalian cell substrates used to produce biological products. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, v. 41, n. 3-4, p. 65-70, 2005.
- SCHIRRMIEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K. *et al.* Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.*, v. 85, n. 12, p. 3647-3652, 2004.
- SHIMADA, Y. Researchers should have respect for the originator of the cell lines. *Clin. Cancer Res.*, v. 11, n. 12, p. 4634, 2005.
- SOARES, R. M.; DURIGON, E. L.; BERSANO, J. G. *et al.* Detection of porcineparvovirus DNA by the polymerase chain reaction assay using primers to the highlyconserved nonstructural protein gene, NS-1. *J Virol Methods*, v. 78, n. 1-2, p. 191-198, 1999.
- STREK, A. F. *Detecção e caracterização de amostras de parvovirus suíno*. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- STUDER, E.; BERTONI, G.; CANDRIAN, U. Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines. *Biologicals*, v. 30, n. 4, p. 289-296, 2002.
- STUDY Group on cell substrates for production of biologicals, Geneva, Switzerland: WHO, 2007.

- SZELEI, J.; LIU, K.; LI, Y. *et al.* Parvovirus 4-like virus in blood products. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 16, n. 3, p. 561-564, 2010.
- TANG, J.; HU, M.; LEE, S. *et al.* A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. *J. Microbiol. Methods*, v.39, n. 2, p. 121-126, 2000.
- TATTERSALL, P. The evolution of parvovirus taxonomy, . In: KERR, J. R.; COTMORE, S. F.; PARRISH, C. R. (Eds.) *et al. Parvoviruses*. London, United Kingdom: Hodder Arnold, 2006. P.5–14.
- TEIXEIRA T.F.; DEZEN D.; CIBULSKI S.P. *et al.* Torque teno sus virus (TTSuV) in cell cultures and trypsin. *PLoS One*, v. 6, n.3, p. 17501 (1-7), 2011.
- TERMINOLOGY associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. SIVB, 1990. Disponível em: <[http://www.sivb.org/edu\\_terminology.asp](http://www.sivb.org/edu_terminology.asp)>. Acessado em: 30.12.2011.
- TESTS for sterility and freedom from contamination of biological materials. In: MANUAL of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 6.ed. Paris: OIE, 2008. V. 1, cap. 1.1.9, p. 105-114, 2008.
- TIMENETSKY, J M. *Mycoplasmas*. Universidade de São Paulo. ICB II, 2008, 11p. Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/bmm/grad/arquivos/pdfs/jorge.pdf>>. Acesso em: 25/01/2012.
- TIMENETSKY, J.; SANTOS, L.M.; BUZINHANI, M. *et al.* Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz. J. Medi. Biol. Res.*, v. 39, n. 2, p. 907-914, 2006.
- TISCHER, I.; GELDERBLUM, H.; VETTERMANN, W. *et al.* A very small porcine virus with a circular single-stranded DNA. *Nature*, v. 295, n.5844, p. 64–66, 1982.
- TISCHER, I.; RASCH, R.; TOCHTERMANN, G. Characterization of papovavirus- and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines. *Zentralbe Bakteriol Org.*, v. 226, n. 2, p. 153–167, 1974.
- TULLY, J.G.. Mollicutes. In: LEDERBERG, J. (Ed.) *Encyclopedia of microbiology*. New York: Academic Press, 1992. v. 3, p. 181-191.
- UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* v. 35, n. 2, p. 71-74, 2007.
- VAN KUPPEVELD, F. J.; VAN DER LOGT, J. T.; ÂNGULO, A. F. *et al.* Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 58, n. 8, p. 2606-2615, 1992, Erratum in: *Appl Environ Microbiol.* v. 59, n. 2 p. 655, 1993.
- VILCEK, S. Identification of pestiviruses contaminating cell lines and fetal calf sera. *Acta Virol.*, v. 45, n. 2, p. 81-86, 2001.
- VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M. *et al.* Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev. Vet. Med.*, v. 72, n. 1-2, p. 31-35 discussion 215-219, 2005.
- VIRAL safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin Q5A (R1). In: ICH harmonised tripartite guideline. London, Emea, 2006.
- VIRUS taxonomy. ICTV/2009. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>, Acessado em: 17/01/2012.
- VOLOKHOV, D. V.; GRAHAM, L. J.; BRORSON, K.A. *et al.* Mycoplasma testing of cell substrates and biologics: Review of alternative non-microbiological techniques. *Mol. Cell. Probes.*, v. 25, n. 2-3, p. 69-77, 2011.

WANG C.; PANG, V. F.; JENG, C. R. *et al.* Detection of porcine circovirus type 1 in commercial porcine vaccines by loop-mediated isothermal amplification. *Folia Microbiol.*, v. 56, n. 6, p. 483- 489, 2011.

WENGLER, G.; BRADLEY, D. W.; COLLETT, M. S. *et al.* Flaviviridae. In: Murpy, F. A.; FAUQUET, C. M.; SUMMERS, M. D.(Eds.) *et al. Virus taxonomy, report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Springer, 1995. p. 415-427.

WEISBURG, W. G.; TULLY, J. G.; ROSE D. L. *et al.* A phylogenetic analysis of the mycoplasma: Basis for their classification. *J. Bacteriol.*, v. 171, n. 12, p. 6455-6467, 1989.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhea virus in pooled bovine serum. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 1, p. 343-346, 2001a.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A. E. Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in pooled bovine serum. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, n. 1, p. 343-346, 2001b.

WESSMAN, S. J.; LEVINGS, R. L. Collective experiences of adventitious viruses of animal-derived raw materials and what can be done about them. *Cytotechnology.*, v. 28, n. 1-3, p. 43-48, 1998.

WILBUR, L. A.; EVERMANN, J. F.; LEVINGS, R. L. *et al.* Abortion and death in pregnant bitches associated with a canine vaccine contaminated with bluetongue virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 204, n. 11, p. 1762-1765, 1994.

ZHI, Y.; MAYHEW, A.; SENG, N. *et al.* 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, 2010.

ZIMMERMANN, P.; RITZMANN, M.; SELBITZ, H. J. *et al.* VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *J. Gen. Virol.*, v. 87, n. 2, p. 295-301, 2006.