

Recomendações para a padronização da pesquisa de micoplasmas em animais, soros, cultivos celulares e produtos biofarmacêuticos de aplicação biomédica

¹ Caio Maurício Mendes de Cordova*, ² Evelyn Lobo Rivero

1. Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Regional de Blumenau - FURB
cmcordova@furb.br
2. Laboratório de Diagnóstico de Micoplasmas Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria -
CENSA - La Habana, Cuba - elobo@censa.edu.cu

Neste artigo, buscamos analisar os métodos disponíveis para a detecção de micoplasmas em produtos biológicos e biofarmacêuticos, e recomendar uma padronização dos serviços solicitados aos laboratórios de pesquisa de micoplasmas por diferentes centros científicos e farmacêuticos. As diferentes farmacopéias reconhecem o cultivo microbiológico para a detecção de micoplasmas como método de referência, e a coloração de DNA (DNA *staining*) como método alternativo na pesquisa destes microrganismos em produtos farmacêuticos, animais e biotecnológicos. A partir de 2007 se reconhece a utilização de técnicas moleculares para a detecção dos micoplasmas, especialmente a PCR, por sua alta sensibilidade e especificidade. Nas Américas, com exceção dos Estados Unidos, não existe uma harmonização das técnicas de diagnóstico de micoplasmas dentro das normas internacionais de qualidade, entre os raros laboratórios que realizam estes tipos de testes. Com base nas características destes microrganismos e das diferentes metodologias, recomendamos que os laboratórios que realizam a detecção de micoplasmas em produtos animais ou biofarmacêuticos de aplicação biomédica utilizem ao menos duas técnicas de diagnóstico, sejam elas a cultura nos meios Hayflick, Frey e Friis, e a PCR *in house* com o uso de *primers* genéricos ou *kit* comercial validado. O principal impacto destas recomendações se dá no aspecto social, por uma contribuição com a segurança dos produtos obtidos por biotecnologia em todos os países, e para a população que os utiliza, além de que possibilita a exportação destes produtos com a qualidade necessária, cumprindo os parâmetros exigidos pelas agências reguladoras internacionais

Palavras-Chave: micoplasma, mollicute, cultura celular, contaminação.

1. O estado da arte

Os micoplasmas fazem parte da classe Mollicutes, um grande grupo de microrganismos peculiares, responsáveis por uma série de doenças nos animais, nas plantas e no homem, notadamente Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) e infecções respiratórias. Suas maiores características são a ausência de parede celular e o genoma reduzido⁽¹⁾.

Além disso, os micoplasmas são responsáveis por até 96% das contaminações de linhagens celulares, e, portanto indesejáveis na obtenção de vacinas e produtos biofarmacêuticos. Sua presença pode acarretar diferentes efeitos citogenéticos, como depleção dos nutrientes celulares, alteração das características de crescimento, inibição do metabolismo celular, interrupção da síntese de ácidos nucleicos, produção de aberrações cromossômicas,

mudanças na antigenicidade da membrana celular e interferência da replicação viral⁽²⁾.

As organizações internacionais exigem cada vez mais e ao mesmo tempo é uma necessidade dos clientes que fazem uso de um serviço de detecção de micoplasmas, que se cumpram as regulamentações existentes sobre a qualidade destes serviços, e se empreguem métodos validados reconhecidos pelas diferentes normas. A validação de um método não depende que este seja qualitativo ou quantitativo, pois validar consiste em verificar e documentar sua validade e, portanto sua adequação a requisitos previamente estabelecidos, sendo que a maioria dos parâmetros qualitativos, por serem de natureza binária (Positivo/Negativo), se expressam em termos de probabilidade⁽³⁾. Se bem que o conceito de validação não depende destes critérios, na prática, os parâmetros de qualidade

que caracterizam os métodos qualitativos são distintos⁽⁴⁾.

Assim, por exemplo, têm sido definidos parâmetros de qualidade como: sensibilidade, especificidade, limite de detecção, limite de corte, reprodutibilidade, exatidão, etc.⁽⁵⁾.

As diferentes farmacopéias reconhecem o cultivo microbiológico para a detecção de micoplasmas como método de referência, e a coloração de DNA (DNA staining) como método alternativo a ser utilizado na pesquisa destes microrganismos em produtos farmacêuticos, animais e biotecnológicos. A partir de 2007 se reconhece pelas diferentes farmacopéias a utilização de técnicas moleculares para a detecção dos micoplasmas, especialmente a PCR, por sua alta sensibilidade e especificidade⁽⁶⁻⁸⁾.

Para demonstrar a confiabilidade dos resultados dos métodos utilizados neste diagnóstico torna-se imprescindível alcançar a validação e acreditação das técnicas fundamentais que são reconhecidas pelas agências reguladoras, como o cultivo microbiológico, a coloração de DNA e a PCR⁽⁹⁾. Assim, buscamos cumprir os requisitos para manter o serviço de detecção de micoplasmas em produtos biológicos e biofarmacêuticos, o qual é solicitado aos nossos laboratórios por diferentes centros científicos e farmacêuticos. A incorporação destes ensaios possibilita a comercialização e mesmo a exportação de produtos confiáveis, e que cumprem os parâmetros de qualidade estabelecidos para os mesmos.

Como resultado da busca de informação científica e tecnológica, se identificam as principais organizações que regem internacionalmente a atividade de acreditação de ensaios, destacando-se: a ILAC (Cooperação Internacional de Acreditação de Laboratórios), ALAC (Cooperação Ásia Pacífico para a Acreditação de Laboratório) e a IAAC (Cooperação Internacional Interamericana para a Acreditação de Laboratórios). Em Cuba existe o Órgano de Acreditación Nacional para la República de Cuba (ONARC), que tem reconhecimento internacional e que verifica o cumprimento dos requisitos que devem seguir os laboratórios para obter a acreditação. Da mesma forma, no Brasil este papel é desempenhado pela Organização Nacional de Acreditação (ONA), na acreditação dos laboratórios de ensaios.

O serviço referenciado de detecção de micoplasmas requer uma alta especialização técnica e científica, disponível somente em poucos centros de internacionais, com altos custos. Uma única análise tem um custo para o cliente de USD

\$ 299, como nos serviços prestados pela ATCC (American Culture Type Collection) e o Laboratório para o Controle de Biológicos (National Institute for Public Health, P.O Box 13720 BA Bilthoven, Holanda), assim como o Centro de Investigaciones Biológicas de España, onde a detecção de micoplasmas em uma amostra custa 80 Euros. Preços similares são praticados pelo banco de cultivo de células do Japão (Riken Bank).

Assim, a detecção de micoplasmas é realizada em nível internacional por poucos laboratórios acreditados para este fim, fundamentalmente na Europa (Itália, Holanda, Áustria, Espanha, Suécia, UK) e no Japão. Entretanto, nas Américas, com exceção dos Estados Unidos, que está integrado a este grupo, não existe uma harmonização das técnicas de diagnóstico de micoplasmas dentro das normas internacionais de qualidade, entre os raros laboratórios que realizam estes tipos de testes. Portanto, contar com um Sistema de Gestão da Qualidade dentro das normas ISO/IEC 170245 e cumprir o regulamento estabelecido para este fim pela literatura de referência internacional e pelas diversas farmacopéias, assim como pela OMS⁽¹⁰⁾, é de grande importância para o desenvolvimento desta temática em nossa região. A harmonização e padronização destes procedimentos possibilitaria a comercialização e exportação de produtos biológicos confiáveis que cumpram os parâmetros de qualidade estabelecidos internacionalmente.

Neste artigo buscamos discutir a harmonização das técnicas de diagnóstico de micoplasmas, partindo da experiência do Brasil e Cuba nesta área. Através dos estudos desenvolvidos em nossos laboratórios, procuramos determinar a melhor metodologia para o cultivo microbiológico utilizado na detecção de micoplasmas em produtos biológicos e biofarmacêuticos, de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Européia de 2006, pela OMS e pela literatura internacional.

Da mesma forma, procuramos determinar qual o teste molecular mais adequado para a detecção de micoplasmas nestes materiais, bem como estabelecer os controles de qualidade para a determinação dos parâmetros de desempenho dos métodos utilizados, dentro da norma ISO/IEC 17025 de 2006.

2. Recomendações

Com o desenvolvimento crescente da Biotecnologia, são lançados ao mercado novos produtos biofarmacêuticos, tanto para humanos

como para uso veterinário, em escala crescente. Organizações internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2000), a Organização Pan-Americana de Saúde⁽¹¹⁾ e a Organização Internacional de Saúde Animal⁽⁵⁾ têm regulamentado, desde a década de 1980, a realização de Testes de Esterilidade para micoplasmas, ou mollicutes, como parte das Normas Gerais de Esterilidade para Substâncias Biológicas, sendo uma prova conclusiva para a liberação ou não destes produtos biológicos.

As principais espécies de micoplasmas que infectam produtos animais ou biofarmacêuticos são *Acholeplasma laidlawii*, encontrado principalmente em vacinas (soro) para uso humano e veterinário quando foram utilizados antibióticos na sua produção; *Mycoplasma gallisepticum* e *M. synoviae*, quando produtos de origem aviária foram utilizados na produção, ou quando se trata de vacinas destinadas às aves; *Mycoplasma hyorhinis*, em vacinas veterinárias de aplicação não-aviária (principalmente em suínos); *Mycoplasma orale*, em vacinas para uso humano ou veterinário; e *Mycoplasma pneumoniae* e *M. fermentans*, em vacinas para uso humano^(2, 12).

Assim, os meios mais adequados para a cultura de micoplasmas que possam estar infectando este tipo de material são o Hayflick, que reúne as condições e nutrientes para o crescimento da maioria das espécies de mollicutes menos exigentes, o meio de Frey, que permite especialmente o crescimento de *M. synoviae*, e o meio de Friis, adequado para a detecção das demais espécies de mollicutes, especialmente as de origem suína. Cada amostra deve ser inoculada nos três meios de cultura. As culturas devem ser incubadas a 35-38°C em condições de microaerofilia (5-10% de CO₂) em câmara úmida, por ao menos até 21 dias. Devem ser utilizados ao menos 10 mL de amostra inoculados em 100 mL de meio. Caso ocorram mudanças de pH após a adição da amostra, denotada pela mudança de cor do indicador vermelho de fenol, o pH pode ser corrigido adicionando-se NaOH ou HCl a 10% estéril. Da mesma forma, 0,2 mL da amostra devem ser inoculados em meio de cultura sólido (acrescido de 1% de ágar bacteriológico no preparo). Após 4 dias de incubação em meio líquido, este deve ser subcultivado inoculando-se 0,2 mL em uma placa com meio sólido. Este procedimento deve ser repetido nos dias 8, 15 e 21, para descartar um resultado positivo. As culturas devem ser observadas a cada 2 dias. Caso seja observada mudança de cor do indicador em meio líquido, a cultura deve ser subcultivada em

meio sólido. No caso de ser observada contaminação bacteriana ou fúngica (turvação da cultura), o teste é inválido, e nova amostra deve ser providenciada⁽¹²⁾.

Outra abordagem possível é a detecção dos micoplasmas por métodos moleculares. As técnicas de coloração de DNA utilizam substâncias fluorescentes que se ligam ao ácido nucléico. Além de trabalhosas, resultados falso-positivos podem ser obtidos com a presença de vírus, ou mesmo outras bactérias⁽¹²⁾.

Nos melhores laboratórios, o limite de detecção da coloração de DNA é de 102 UFC/mL, e da PCR é de 10 UFC/mL. Deste modo, técnicas de amplificação específica do ácido nucléico, como a PCR utilizada diretamente em alíquotas das amostras, substituem com vantagem as técnicas de coloração de DNA. A utilização de controles internos e externos de reação é essencial para a detecção da presença de eventuais inibidores da reação de amplificação. Existem também kits comerciais para a detecção de micoplasmas por PCR, mas mesmo estes devem ser validados pelo laboratório, com o uso de cepas de referência como controle. Alternativamente existe uma reação clássica de detecção de micoplasmas com primers genéricos (MGSO e GPO1), capazes de detectar virtualmente qualquer espécie de mollicute⁽¹³⁾. Vários outros primers foram desenvolvidos por diferentes autores para a pesquisa de micoplasmas nestes materiais⁽¹⁴⁾. Porém, em nossa experiência, não recomendamos que a PCR substitua a cultura na pesquisa de micoplasmas neste tipo de amostras, pois, embora raramente, pode-se observar a detecção de sua presença por cultura, e não por PCR, e vice-versa. Assim, a cultura e a PCR são métodos complementares, de forma a garantir a acurácia e a confiabilidade dos resultados obtidos, principalmente os que indicam que o material analisado está livre da presença de micoplasmas.

Como cepas controle, recomendamos a utilização de ao menos uma cepa de referência, por exemplo, *Mycoplasma orale*, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini* ou *Mycoplasma hyorhinis*. Estas cepas devem ser utilizadas para a validação dos kits comerciais de PCR, ou na otimização da técnica de PCR in house com os primers genéricos MGSO e GPO1. Além disso, a cada lote de meio de cultura produzido, deve ser feito um teste de quantificação de um inóculo de concentração conhecida, armazenado a -80°C.

Uma quantificação em microplaca com diluições seriadas de razão 10 não deve apresentar uma diferença maior do que um título com relação ao valor esperado⁽¹²⁾. De forma

semelhante, pode ser feita a pesquisa de substâncias inibidoras, realizando a cultura de cepas controle na presença e na ausência da amostra a ser testada. Entretanto, utilizando um método molecular, como a PCR, além da cultura na detecção de micoplasmas, esta etapa não se torna obrigatória, o que reduz também os custos do procedimento.

3. Conclusões

Recomendamos que os laboratórios que realizam a detecção de micoplasmas em produtos animais ou biofarmacêuticos de aplicação biomédica utilizem ao menos duas técnicas de diagnóstico, sejam elas a cultura nos meios Hayflick, Frey e Friis, e a PCR *in house* com o uso de primers genéricos ou kit comercial validado. Além disso, é essencial que a busca da acreditação dos processos por organismo competente, e a participação em programas externos de controle de qualidade, seja o objetivo prioritário dos laboratórios de detecção de micoplasmas. Na inexistência de programas de controle de qualidade patrocinados por entidades técnicas ou científicas, a organização de uma colaboração inter-laboratorial preenche esta lacuna.

O principal impacto destas recomendações se dá no aspecto social, por uma contribuição com a segurança dos produtos obtidos por biotecnologia em todos os países, e para a população que os utiliza, além de que possibilita a exportação destes produtos com a qualidade necessária, cumprindo os parâmetros exigidos pelas agências reguladoras internacionais. Além disso, será assegurada uma maior confiabilidade diagnóstica para as micoplasmoses animais. Uma vez concluídos os objetivos, a sociedade poderá contar com tecnologias avançadas, validadas e acreditadas para a detecção de micoplasmas, podendo oferecer o serviço de detecção destes microrganismos, assim como identificar a fonte de infecção pelos mesmos, com o uso de técnicas de alta sensibilidade e especificidade corretamente validadas, o que contribuirá para a segurança dos produtos biológicos e biofarmacêuticos de aplicação biomédica e, portanto para a segurança da população que os recebe.

4. Referências

1. Razin S, Yogeve D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(4):1094-156.
2. Cheng H-S, Chen C-W, Wang S-H. Effect of storage conditions on detection of mycoplasma in

- biopharmaceutical products. *In Vitro Cell Dev Biol.* 2007; 43(3-4):113-9.
3. ISO/CASCO. ISO/IEC 17025. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y de calibración. [local desconhecido]: ISO; 2005.
4. Oficina Guatemalteca de Acreditación (GA). Política de la Oficina Guatemalteca de Acreditación. Para la Selección y Validación de Métodos de Ensayo. Guatemala: OGA; 2005. p2-30.
5. Office International Des Epizooties. Manual of Standards for diagnostic test and vaccines. Paris:OIE, 3 ed; 2005. p512-21.
6. Lobo E, Hernández Y, Betancourt A, Martínez S. Validación de un ensayo Hibridación de ácidos nucleicos (HAN) para la detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante el empleo de un Kit diagnóstico. *Redvet.* 2006; VII(11). Disponível em: < <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html>>. Acessado em: 17 jul. 2009.
7. British Pharmacopoeia (Veterinary). Test for Absence of Mycoplasmas. Appendix XVI B 3, [London]:The Stationery Office; 2000. pA17-9.
8. Code of Federal Regulations. Animals and Animal products. Detection of mycoplasma contamination. 9 CFR. Ch. 1 ed ; 2001. p565-566. Disponível em: <http://cfr.vlex.com/vid/detection-mycoplasma-contamination-19610730>, acessado em 08/10/2010.
9. Ruisánchez I, Trullols E, Rius FX. Validación de métodos analíticos cualitativos, 2005. Disponível em <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/divcualit3.pdf>, Acessado em 05/06/2009.
10. World Health Organization. General requirements for the sterility of biological substance. WHO Technical report Series. N. 872 Annex 3. Genebra: WHO; 2000. p69-74.
11. Organización Panamericana de la Salud. General requirements for the sterility of biological substances. WHO Technical report Series. n. 373. Washington:OPS; 2000. p70-6.
12. European Directorate for the Quality of Medicines - Council of Europe (COE). European Pharmacopoeia. Mycoplasmas. [local desconhecido]: BDC; 2007. p5201-5.
13. Dussurget O, Henry A, Lemerrier B, Roulland-Dussoix D. Polymerase chain reaction-based diagnosis of mollicute infection of commercial animal sera. *J Microbiol Methods.* 1994; 20(2):125-35.
14. Stormer M, Vollmer T, Henrich B, Kleesiek K, Dreier J. Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminants and clinically important mollicute species. *International Journal of Medical Microbiology.* 2009; 299(4):291-300, 2009.

Abstract

Recommendations for the standardization of mycoplasma detection in animals, serum, cell cultures and biopharmaceutical products of biomedical use.

In this paper, we analyze the available methods for mycoplasma detection in biological and biopharmaceutical products, and recommend a standardization of the services available from the laboratories of mycoplasma detection on different scientific and pharmaceutical centers. The different Pharmacopoeia recognize the microbiologic cultivation of mycoplasmas as a reference method, and DNA staining as an alternative one to be used in the detection of these microorganisms in pharmaceutical, animal and biotechnological products. Since 2007 it is recognized the use of molecular techniques, especially the PCR, for its high sensitivity and specificity. A referenced service of mycoplasma detection requires high technical and scientific specialization, available only in a few international facilities. In the Americas, with the exception of the USA, there is no standardization for mycoplasma detection

techniques regarding international quality Standards, among the few laboratories which perform these types of tests. Based on these microorganisms characteristics and the different detection methods, we recommend that laboratories that perform mycoplasma detection in animal or biopharmaceutical products use at least two diagnostic techniques, namely culture in Hayflick, Frey and Friis media, and in house PCR with generic primers or a validated commercial kit. The main impact of these recommendations is social, by its contribution to the safety of products obtained through biotechnology in every country, and for the population who uses it, and also allow the exportation of these products with the required quality, accomplishing the standards defined by the international regulatory agencies.

Keywords: mycoplasma, mollicute, cell culture, contamination.