

Utilização de técnicas direta (cultivo) e indireta (coloração de DNA pelo DAPI) para detecção de micoplasmas contaminantes de cultivos celulares

Utilization of direct (culture) and indirect (DNA colorization by DAPI) techniques for Mycoplasma contaminants detection in cell culture

Simone Perecmanis,* Maira Halfen Teixeira Liberal,** Claudio de Moraes Andrade,*** Luiz Otavio Barroso Pereira,****
Luiz Claudio Motta de Oliveira****

Resumo

Trinta cultivos celulares de cinco Instituições de Ensino e Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro foram testadas por duas técnicas diferentes, cultivo em caldo e agar SP4 e coloração de DNA, para a detecção de micoplasmas contaminantes de cultivos celulares, que são, na atualidade, os causadores de maior prejuízo para laboratórios, mas não foram encontrados resultados positivos.

Palavras-chave: micoplasma; cultivo celular; contaminação.

Abstract

Thirty samples of cell culture, obtained in five Research and Education Institutions, were tested by culture in SP4 broth and agar and the DNA colouring by DAPI but no one of the samples were positive. Mycoplasmas are today the most important contaminant of cell cultures because it does not cause macroscopic alteration in the cultures, but can leave the cell to death.

Keywords: mycoplasma; cell culture; contamination.

Introdução

Os cultivos de tecido e cultivos celulares criados no início do século como modelo de estudo do comportamento de células animais livres de variação ambiental passaram a ter uma fundamental utilização em ciências como a Virologia, a Oncologia, a Farmacologia, a Genética (Freshney, 1988) e biologia molecular a partir dos anos 50.

As dificuldades iniciais com a manutenção dos cultivos foram gradativamente sendo resolvidas com a utilização de meios de cultura apropriados, esterilização adequada de vidraria e técnicas seguras de manipulação. A maioria das contaminações originárias dos próprios tecidos coletados ou introduzidas durante o manuseio dos cultivos foi controlada com a adição de antibióticos e antifúngicos aos meios, mas estes não conseguiram evitar a contaminação por micoplasmas (Lustig e Nebel, 1981).

O primeiro relato de cultivo celular contaminado por micoplasmas foi feito em 1956 (Robinson et al., 1956), fato que foi confirmado nos quarenta anos seguintes, com citações de diversos autores ratificando este primeiro achado

(Collier, 1957; Barile e Klen, 1971; Hopps et al., 1973; Rothen e Barile, 1993; Timenetsky, 1997).

Os micoplasmas são os menores procariontes existentes, 300 nm de diâmetro, não possuem parede celular, apresentam uma membrana trilaminar (Razin, 1983) e passam por filtros de poros de 0,22 µm de diâmetro quando sob pressão, devido à sua plasticidade (Barile, 1981).

A contaminação por micoplasmas pode ser oriunda dos técnicos que trabalham no laboratório, do soro animal utilizado (Rodriguez et al., 1987) e de aerossóis formados durante a tripsinização das células (O'Connell et al., 1964).

Embora essa contaminação possa ser inaparente, sem provocar alterações macroscópicas do tecido, os micoplasmas podem afetar os cultivos por produção de metabólitos tóxicos (McGarrity e Carson, 1982) ou utilizando componentes do meio de cultivo, privando a célula de aminoácidos e nucleosídeos essenciais, produzindo citopatologias e aberrações cromossômicas (Barile, 1981). Podem ainda mimetizar efeitos citopáticos virais, inibi-los ou exacerbá-los (Lo et al., 1991), ou mesmo alterar sítios antigênicos de ligação celular para anticorpos monoclonais (Oredipe et al., 1990).

* Mestre em Microbiologia Veterinária UFRRJ.

** PESAGRO-RIO.

*** Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública/IV, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, CEP 23851-970 – Seropédica, RJ, Brasil.

**** Laboratório de Controle Microbiológico- CÔMIC-FIOCRUZ.

No Brasil, poucos foram os relatos de isolamento de micoplasmas contaminantes de cultivos celulares. A primeira caracterização foi com microscopia eletrônica, no Instituto Oswaldo Cruz (Majerowicz e Barth, 1986) e os primeiros isolamentos foram obtidos em um estudo realizado de 1983 a 1988 pelo Instituto Butantã (Myaki et al., 1989), onde em 106 amostras de linhagens celulares, 48 apresentaram-se contaminadas. Em 1990, em um estudo posterior, foi feita a primeira identificação de micoplasmas contaminantes de cultivos celulares, sendo avaliadas 17 amostras de linhagens de cultivos com o resultado de 15 amostras positivas para *Acholeplasma laidlawii* (Timenetsky, 1990). A última notificação no Brasil de cultivos contaminados com micoplasmas foi realizada por Mettifogo et al. (1997), que isolaram, em Londrina, de uma amostra de um cultivo de células da linhagem MDBK uma cepa de *Mycoplasma spp.*

No Estado do Rio de Janeiro, não havia sido realizado ainda nenhum levantamento sobre a ocorrência de cultivos contaminados por micoplasmas, motivando, então, a realização deste trabalho junto a cinco instituições de pesquisa e ensino, ainda que algumas dessas instituições já houvessem realizado testes de controle para a contaminação por este tipo de microrganismo.

Material e métodos

Para este trabalho foram utilizadas duas técnicas de detecção: uma direta – o cultivo em caldo e agar SP4 – e uma indireta – a técnica de coloração de DNA.

Origem das amostras

As amostras de cultivos celulares foram obtidas de cinco instituições de ensino e pesquisa do Rio de Janeiro denominadas de A, B, C, D, E e encontram-se distribuídas por instituição na Tabela 1. Foram trabalhadas 30 amostras de cultivos celulares das seguintes linhagens:

LLMCK2 (rim de macaco Rhesus), MDCK (rim de Cocker Spaniel), VERO (rim de macaco verde adulto), McCoy (fibroblasto de tecido subcutâneo), MA104 (rim de feto de macaco Rhesus), HEP2 (carcinoma de laringe), HeLa (Adenocarcinoma de cérvix uterina), HEK (rim de embrião humano), BHK21 (rim de neonato de hamster), BGM (rim de macaco verde africano), GBK (rim de bovino), PK15 (rim de suíno) e TH (célula de peixe).

Acondicionamento original e processamento das células utilizadas (da recepção à segunda "passagem")

A maioria das células foi recebida em garrafas, em monocamadas, com exceção de três amostras (uma amostra de BHK21, uma de GBK e uma de PK15), que vieram congeladas em ampolas de vidro e que foram semeadas em garrafas de vidro do tipo "xarope" com meio MEM GLASGOW, acrescido em 10% de soro fetal bovino pré-testado contra micoplasmas, da marca GIBCO e incubadas durante 48 horas em estufa a 37°C para crescerem e depois serem processadas.

As amostras celulares restantes, ao chegarem ao laboratório, foram mantidas por mais 48 horas sem manipulação, e após esse período de descanso foram tripsinizadas, para o

descolamento das mesmas do fundo das garrafas de cultivo, e 1,5 ml da suspensão de tripsina e células, mais 0,5 ml do meio original foram congelados a -20°C para a inoculação em caldo e agar SP4 e para a técnica de coloração de DNA. O restante foi adicionado de meio GLASGOW, mais 10% de soro fetal bovino e acrescido de penicilina e estreptomicina, sendo novamente colocadas para crescer em estufa a 37°C por 48 horas. Após este período ficaram mais 48 horas sem manipulação, foram novamente tripsinizadas e dessa vez centrifugadas a 4°C por 10 minutos à 300 X g. Após a tripsina ser dispensada, foram adicionadas de meio para congelamento de célula, sendo coletado 2ml e congelado a -20°C, para o cultivo em caldo e agar SP4 e coloração de DNA.

O motivo pelo qual as garrafas originais foram duplicadas com uma passagem dentro do laboratório, foi aumentar a quantidade de células e para estimular o crescimento de micoplasmas que estivessem fastidiosos com o possível recém-descongelamento de muitas das amostras das células.

Controles positivos

Os controles positivos utilizados foram duas amostras-padrão de micoplasmas, o *Mycoplasma bovis* e o *Acholeplasma laidlawii*, gentilmente cedidas pela Dra. Maria Angela Orsi.

Técnica de detecção direta (cultivo em caldo e agar SP4)

Foram inoculados 0,3 ml de cada uma das suspensões contendo meio mais células em três tubos 13 X 100 de vidro contendo 5ml de caldo SP4 (Tuly, 1996). Os tubos foram incubados a 37°C em estufas de cultivo, e observados diariamente para a verificação de alteração de pH, através da mudança de cor no indicador utilizado no meio, e de turvação, que seriam indicativos de crescimento bacteriano. Após a 1ª semana de incubação, mesmo não apresentando alterações visíveis como mudança de pH ou turvação, retirou-se 0,5 ml dos tubos contendo caldo SP4 2 e inoculou-se em placas contendo agar SP4. Estas placas foram incubadas durante 21 dias, a 37°C em estufa em microaerofilia obtida com uso de jarra e vela, sendo observadas de três em três dias para a visualização de colônias características em forma de "ovo frito".

As duas cepas de micoplasma utilizadas como controles positivos apresentaram crescimento em 48 horas com turvação do meio e, no caso do *A. laidlawii*, com mudança de cor do indicador, aferindo desta maneira os meios utilizados.

Técnica indireta (técnica de detecção por coloração de DNA)

Foi utilizada uma técnica baseada nas preconizadas por Chen (1977) e pelo CDC (Velleca et al., 1980), para a detecção de micoplasmas não cultiváveis, que consiste em inocular as células suspeitas em um sistema de células indicadoras e posterior coloração com corante fluorescente com afinidade por DNA, e observação com microscópio de epifluorescência.

Soluções químicas utilizadas:

Fixador de Carnoy: ácido acético glacial e metanol absoluto na proporção de 1:4 respectivamente.

DAPI: Diamino fenil indol, em solução de 0,1mg / ml.

Solução de Macllvaine: 22,2 ml de ácido cítrico mais 27,8 ml de fosfato de sódio.

Células utilizadas:

O sistema celular indicador utilizado foi o das células VERO, na proporção de 5000 células / ml de meio com 3% de soro fetal, distribuídas em placas de seis orifícios incubadas em estufas de CO₂ (5%) a 37°C durante dois dias.

Procedimento:

O meio utilizado para fazer crescer as células nas placas foi descartado, e estas foram inoculadas juntamente com 0,2 ml da suspensão das amostras de células suspeitas, em cada poço das placas, que foi completado após a inoculação com 1,8 ml de meio para chegar ao volume final de 2 ml. Posteriormente, foram novamente incubadas em estufa de CO₂ a 37°C durante dois dias. Após este período o meio foi descartado com pipeta e adicionaram-se em cada poço de cada placa, 2 ml do fixador de Carnoy em dois tempos de cinco minutos. O fixador foi então descartado e as placas submetidas a secagem em temperatura ambiente. Depois de secas, foram coradas com o DAPI, mantido em contato com as células por 20 minutos, e depois lavadas 3X lentamente com água desmineralizada e novamente secas em temperatura ambiente. Por último, cada poço nas placas foi acrescido de 1 gota da solução de MacIlvaine e cobertos com lamínula. A leitura das placas foi realizada em microscópio de fluorescência com a seguinte combinação de filtros: U+ 420k+W330-380 e a objetiva de UV 10X.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos pela técnica de cultivo e coloração de DNA encontram-se na Tabela 1.

Como pode ser observado, mesmo com o uso de duas técnicas, as mesmas utilizadas pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) norte-americano, a técnica de cultivo em caldo e agar SP4 (Tully, 1996) e coloração de DNA (Velleca et al., 1990) para a detecção de micoplasmas contaminantes de cultivos celulares, os resultados obtidos foram negativos. Pela técnica de coloração de DNA foram encontrados três resultados falso-positivos para micoplasmas. Estas três suspensões celulares foram semeadas em agar sangue, EMB agar e novamente semeadas em caldo e agar SP4, sendo encontrados crescimentos bacterianos não semelhantes a micoplasmas, provavelmente introduzidos no teste durante a manipulação das amostras.

As freqüências de contaminação encontradas no mundo foram de 15% nos últimos trinta anos nos EUA. (Rotten e Barile, 1993), de 2% a 22%, na década de 80 na Coleção Européia de Cultivo de Células Animais (McGarrity e Kotani, 1985), no Japão uma incidência de 80%, assim como 65% na Argentina (Timenetsky, 1997) e no Brasil, apenas relatos isolados foram encontrados, em sua maioria durante a década de 80 e início da década de 90 (Barth e Majerowicz, 1988, Miyaki et al, 1989 e Timenetsky, 1990).

Não foram conseguidos dados recentes relativos ao estado dessas coleções e instituições citadas nestes países, nem de outros que pudessem mostrar a posição atualizada deste

Tabela 1: Resultados obtidos através da técnica de cultivo em caldo e Agar SP4 e Coloração de DNA (DAPI) das amostras de cultivos celulares testadas

| Linhagem | Instituição | Nº de Repliques Caldo / Agar | coloração de DNA (DAPI) | Resultado |
|----------|-------------|------------------------------|---------------------------|-----------|
| LLMCK2 | E | 1 | Negativo | Negativo |
| LLMCK2 | A | 1 | Negativo | Negativo |
| MDCK | E | 1 | Negativo | Negativo |
| MDCK | A | 1 | Negativo | Negativo |
| VERO | A | 1 | Negativo | Negativo |
| VERO | B | 1 | Negativo | Negativo |
| VERO | E | 1 | Negativo | Negativo |
| McCoy | A | 1 | falso positivo | Negativo |
| McCoy | D | 1 | Negativo | Negativo |
| McCoy | E | 1 | Negativo | Negativo |
| HeLa | A | 1 | Negativo | Negativo |
| HeLa | E | 1 | Negativo | Negativo |
| TH | E | 1 | Negativo | Negativo |
| BHK21 | A | 1 | Negativo | Negativo |
| BHK21 | C | 1 | Negativo | Negativo |
| BHK21 | E | 1 | Negativo | Negativo |
| BHK21 | E | 1 | Negativo | Negativo |
| BHK21 | E | 1 | Negativo | Negativo |
| BGM | A | 1 | negativo | Negativo |
| BGM | E | 1 | Negativo | Negativo |
| PK15 | C | 1 | falso positivo | Negativo |
| PK15 | E | 1 | Negativo | Negativo |
| PK15 | A | 1 | Negativo | Negativo |
| MA104 | A | 1 | Negativo | Negativo |
| MA104 | E | 1 | Negativo | Negativo |
| HEP | A | 1 | Negativo | Negativo |
| HEP | E | 1 | Negativo | Negativo |
| HEK | A | 1 | falso positivo | Negativo |
| HEK | E | 1 | Negativo | Negativo |
| GBK | C | 1 | Negativo | Negativo |

fim de década no mundo, quanto à contaminação dos cultivos celulares por micoplasmas. Os resultados obtidos nesta pesquisa poderiam ser discutidos quanto às técnicas utilizadas, mas estas foram aferidas com os microrganismos padrões. As linhagens celulares recebidas foram linhagens de "células mães" e não estavam sendo manipuladas intensamente, sendo então mínimas as chances das mesmas estarem contaminadas. Possivelmente a maioria dos cultivos citados nas pesquisas de outros autores era de cultivos intensamente trabalhados e, por isso, mais sujeitos a contaminações por meios, soros e reagentes contaminados, ou por manipulação inadequada.

Conclusão

As 30 amostras de cultivos celulares testadas apresentaram-se livres de contaminação por micoplasmas. As amostras que apresentaram resultado falso-positivo provavelmente contaminaram-se com outras bactérias durante a coleta das células ou durante a inoculação no sistema indicador Vero.

Conclui-se, então, que as instituições pesquisadas para contaminações de cultivos celulares por micoplasmas trabalham dentro dos padrões técnicos exigidos pelos órgãos mundiais de saúde pública.

Referências bibliográficas

BARILE, M. F. Mycoplasma infection of cell cultures. *Israel J. of Med Sci.* v.17, n.7, p. 555-562, 1981.

BARILE, M.F., KLEN, J. Isolation of *Mycoplasma arginini* from commercial bovine sera and its implications in contaminated cell cultures. *Proc. Soc Exp Biol Med.* v. 38, p. 432-437, 1971.

- BARILE, M.F., HOPPS, H.E., GRABOWSKI, M.W., et al. The identification and sources of Mycoplasmas isolated from contaminated cell cultures. *Annals of the New York Academy Science*, v. 225, p. 252-264, 1973.
- CHEN, T.R. In situ detection of mycoplasma contamination in cell culture by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Research*, v. 104, p. 255-262, 1977.
- COLLIER, L.H. Contamination of stock lines of human carcinoma cells by pleuropneumonia-like organisms. *Nature*, v. 180, p. 757-758, 1957.
- FRESHNEY I. R. *Culture Of Animal Cell: A Manual of Basic Technique* 2. Ed., New York: Alan Liss, 1988, 349 p.
- HOPPS, H.E., MEYER, B. C., BARILE, M.F. Problems concerning "Noncultivable" Mycoplasma contaminants in tissue cultures. *Annals of the New York Academy Science*, v. 225, p. 265-276, 1973.
- LO, S. C., TSAI, S., BEMSH, J.R., et al. Enhancement of HIV1 cytotidal effects in CD4+ lymphocytes by the AIDS-associated Mycoplasmas. *Science-Washington*, v. 251, p. 1074-1076, 1991.
- LUSTIG, E. S., NEBEL, A. Higiene del laboratorio y materiales. In: LUSTIG, E. S., NEBEL. *Cultivo de Tejidos – Un manual práctico*. Inta. Buenos Aires, 1981, 63 p.
- MCGARRITY, G.J., CARSON A. D. Adenosine phosphorylase – mediate nucleoside toxicity. *Exp. Cell Research*, v. 139, p. 199-205, 1982.
- MCGARRITY, G.J., KOTANI, H.. Cell culture mycoplasmas. In: RAZIN, S., BARILE, M.F. *The Mycoplasmas*, New York: Academic Press, 1985, v. 4, p. 353-390.
- METTIFOGO, E., MEDICE, K. C., ALFIERI, A.A., et al. Detecção de *Mycoplasma sp* em cultura de célula MDBK, apresentando efeitos citopáticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., 1997, Rio de Janeiro. *Resumos...* Rio de Janeiro, SBM, 1997, p. 144.
- MYIAKI, 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. Sau Publ S. Paulo*, v. 23, n. 1, p. 39-44, 1989.
- O'CONNEL, R.C., WITTLER, R.G., FABER, J.E. Aerosols as a source of widespread mycoplasma contamination of tissue cultures. *Applied Microbiol.*, v. 12, n. 4, p. 337-342, 1964.
- OREDIPE, O.A., BARTH, R.F., ROTARU, J.H., et al. Alterations in monoclonal antibody affinity and antigenic receptor site expression on Mycoplasma infected human colorectal cancer cells. *Proc. Soc Exp Biol Med.*, v. 194, n. 4, p. 301-307, 1990.
- RAZIN, S. Characteristics of the Mycoplasmas as a group. RAZIN, S., TULLY, J.G. In: *Methods in Mycoplasmaology*. New York: Academic Press, 1983, v. 1, p. 9-13.
- ROBINSON, L.B., WICHELHAUSEN, R. H., RAZMAN, B. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. *Science*, v. 124, p. 1147-1148, 1956.
- RODRIGUEZ, B.V., OTERO, A.J., ALFONSO, J.L., et al. Mycoplasmas y cultivos celulares. *Interferon y Biotecnologia*, v. 4, n. 2, p. 95-107, 1987.
- ROTTEN, S., BARILE, M.F. Beware of Mycoplasmas. *Trends in Biothechnology*, v. 11, n. 4, p. 143-151, 1993.
- TIMENETSKY, J. Isolamento de acholeplasma em diferentes culturas celulares. *Rev. Microbiol.* São Paulo, v. 21, n. 2, p. 153-156, 1990.
- TIMENETSKY, J. Mycoplasma infection in cell cultures. *Virus Research e Reviews*, v. 2 n. 1-2, p. 34-49, 1997.
- TULLY, J.G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mycoplasmas. RAZIN, S., TULLY, J.G. *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. San Diego, California: Academic Press Inc, 1996, v. 1, p. 33-39.
- VELLECA, W.M., BIRD, B. R., FORRESTER, F.T. *Laboratory diagnosis of Mycoplasma infections*. Atlanta, Georgia Center for Diseases Control, Bureau of Laboratories. Laboratory training and consultation division, Virology training branch, 1980, 137 p.