



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

# **DETECCIÓN, TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE *MOLLICUTES* EN CULTIVOS CELULARES**

TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON  
MENCION EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE

AUTOR: Cecilia Stuardo Novoa

TUTORES: Juan Segura Aguilar  
Irmgard Paris Pizarro

2012

### **Agradecimientos:**

Primeramente le doy gracias a **Dios** por haberme acompañado durante todos mis años de estudio y haberme permitido llegar hasta aquí.

Agradezco a mi familia el apoyo constante y a mis amados bankitos por aquellas agradables tardes en el kiosko rojo y las conversaciones ñoñas o bizarras que tuvimos, todas de alguna manera interesantes y bien discutidas.

Agradezco a mis tutores por permitirme realizar este trabajo y facilitar todo para llegar a buen puerto (en serio, ¡gracias por la paciencia!).

No puedo dejar de agradecer infinitamente la ayuda de Mónica, apoyadora a full, persona más motivadora no he conocido, de verdad, ¡GRACIAS!

Finalmente a Sandro, Carlitos, Patty, Uli, Gloria, Karina y Cata por hacer de mi estadía en el laboratorio una experiencia ¡¡maravillosa y divertida!!

## ÍNDICE

	Página
<b>Resumen del proyecto</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>Marco Teórico</b>	
<i>Mollicutes</i>	<b>4</b>
Prevalencia en cultivos celulares	<b>5</b>
Fuentes de contaminación	<b>6</b>
Efectos sobre cultivos celulares	<b>7</b>
Detección	<b>9</b>
Tratamiento	<b>13</b>
Prevención	<b>13</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>16</b>
<b>Objetivos</b>	
Objetivo general	<b>16</b>
Objetivos específicos	<b>16</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	
Cultivos celulares	<b>17</b>
Uso de luz UV	<b>17</b>
Extracción de DNA genómico	<b>17</b>
PCR	<b>18</b>
Tratamiento antibiótico	<b>20</b>
<b>Análisis Estadístico</b>	<b>22</b>
<b>Resultados</b>	<b>23</b>

<b>Discusión</b>	<b>32</b>
<b>Conclusión</b>	<b>36</b>
<b>Referencias Bibliográficas</b>	<b>37</b>

## **RESUMEN DEL PROYECTO**

La contaminación de cultivos celulares por *Mollicutes* es frecuente a nivel mundial y muy relevante ya que estas bacterias producen un amplio rango de alteraciones metabólicas y cromosómicas en las células afectadas que posiblemente alteran los resultados obtenidos, siendo su credibilidad discutible por el hecho de estar modificados y no ser representativos de la situación que se investiga. Considerando estos antecedentes, es necesario detectar periódicamente la presencia de estas bacterias en los cultivos celulares. Para ello se requiere estandarizar una técnica suficientemente sensible y específica que permita asegurar la presencia o ausencia de estos microorganismos. La hipótesis de este proyecto es que la contaminación por *Mollicutes* en cultivos celulares es detectable por PCR convencional y puede ser eliminada con luz UV en los medios de cultivo o tratamiento antibiótico en cultivos celulares, por lo que se implementó un PCR convencional para detectar si hay contaminación por *Mollicutes* en células en cultivo y se evaluó el uso de luz UV en medios de cultivo y distintos tratamientos antibióticos comerciales para erradicar la contaminación en los cultivos celulares. Esto permitió establecer un protocolo adecuado de determinación y descontaminación de *Mollicutes* en cultivos celulares.

## INTRODUCCIÓN

Un gran obstáculo para el desarrollo de la investigación científica ha sido la presencia de contaminantes en los cultivos celulares que a menudo obligan al investigador a eliminar material de trabajo (células, medios), perder tiempo importante empleado en su cuidado además del retraso en la obtención de resultados o de resultados poco representativos debido a la presencia de estos microorganismos en los cultivos.

La contaminación bacteriana de cultivos celulares frecuentemente es simple de detectar y sencilla de tratar y erradicar sin perder mayor número de células y viabilidad en el proceso. Sin embargo, la presencia de *Mollicutes* en cultivos celulares, a diferencia de otras bacterias contaminantes, no muestra efectos aparentes tanto a “ojo desnudo” porque no originan turbidez, como al microscopio óptico ya que no son visibles al ser tan pequeños. Además generan tal cantidad de daño metabólico y cromosómico en las células, que lo recomendable sería entonces desecharlas, porque podrían no representar la condición de estudio sino otra muy diferente y por ende los resultados obtenidos pueden estar alterados.

En una alta proporción de casos, desechar las placas no es una opción viable, sobretodo cuando son biopsias de pacientes o células de las cuales no se tiene respaldo para trabajar. Ante esto existen diversos antibióticos disponibles en el mercado que deben ser probados empíricamente ya que no necesariamente funcionan de la misma manera en todos los tipos celulares, para ello se debe evaluar su citotoxicidad y la sensibilidad de la especie de *Mollicutes* presente en el cultivo.

En el laboratorio donde se realizó este trabajo se sospechó de una contaminación por *Mollicutes* porque se observó un crecimiento lento y algunas veces ausencia de proliferación en valiosos cultivos primarios provenientes de biopsias de pacientes. Dados los antecedentes y para evitar que se repitieran situaciones similares, se determinó

primordial contar con un protocolo para prevenir y vigilar la aparición de *Mollicutes* como contaminantes de cultivos celulares y establecer un tratamiento adecuado para cada tipo celular en caso que sea necesario aplicarlo, sin olvidar que una buena técnica aséptica más otra medida adicional que será desarrollada en este trabajo (irradiación con luz UV) pueden evitar tan problemática situación.

Este trabajo implementó una PCR convencional como técnica de detección de *Mollicutes*, evaluará 4 antibióticos disponibles en el mercado para tratarlos y la irradiación con luz UV (como medida adicional a un manual de buenas prácticas en la cámara de cultivo) para eliminar la eventual contaminación de sueros comerciales o medios de cultivo utilizados para mantener las células en crecimiento.

## MARCO TEÓRICO

### *Mollicutes*

La clase *Mollicutes*, perteneciente al phylum *Tenericutes*, son los procariontes más pequeños encontrados (aprox. 100 - 200 nm) y entre sus características principales se encuentra la carencia de pared celular y su exigencia nutricional, lo cual dificulta su cultivo en el laboratorio (Rivera-Tapia y cols., 2002). Su hábitat es muy amplio, incluye mamíferos, aves, artrópodos, plantas y peces. Además, la cantidad de especies de *Mollicutes* es muy amplia aunque son distintas las especies naturalmente patógenas para cada hospedero (Razin y cols., 1998).

Su taxonomía y sus principales características se resumen en la siguiente tabla:

Clasificación Orden, Familia, Género	Requerimiento de colesterol	Requerimiento de Oxígeno	Hábitat
<i>Mycoplasmatales</i> <i>Mycoplasmataceae</i> <i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i>	Sí Sí	Anaerobio Facultativo Anaerobio Facultativo	Animales y Humanos Animales y Humanos
<i>Entomoplasmatales</i> <i>Entomoplasmataceae</i> <i>Entomoplasma</i> <i>Mesoplasma</i> <i>Spiroplasmataceae</i> <i>Spiroplasma</i>	Sí No Sí	Anaerobio Facultativo Anaerobio Facultativo Anaerobio Facultativo	Plantas e Insectos Plantas e Insectos Plantas e Insectos
<i>Acholeplasmatales</i> <i>Acholeplasmataceae</i> <i>Acholeplasma</i> <i>Phytoplasma</i>	No No determinado	Anaerobio Facultativo No determinado	Animales, Plantas e Insectos Plantas e Insectos
<i>Anaeroplasmatales</i> <i>Anaeroplasmataceae</i> <i>Anaeroplasma</i> <i>Asteroplasma</i>	Sí No	Anaerobio estricto Anaerobio estricto	Bovinos y Ovinos Bovinos y Ovinos

En cuanto a su genoma, poseen una doble hebra circular de DNA que fluctúa entre 500 a 1800 kb, lo que implica que su capacidad codificante es bastante limitada. Esto explica su



característica de parásitos estrictos, lo fastidiosos que son respecto de sus requerimientos nutricionales y su limitada capacidad anabólica que los lleva a buscar, generalmente en células eucariontes, los elementos necesarios para su sobrevivencia y reproducción (Dybvig, 1996). Un ejemplo de esto es que los *Mollicutes* en general no tienen genes involucrados en la síntesis de aminoácidos, poseen sólo unos pocos genes involucrados en la biosíntesis de vitaminas y nucleótidos, la mayoría no puede sintetizar ácidos grasos y algunos incluso incorporan fosfolípidos exógenos junto con colesterol en su membrana celular (Pollack, 2002).

De forma general, estas bacterias pueden ubicarse dentro de la célula en el citoplasma (Baseman y cols., 1995) o de forma perinuclear, sobreviviendo por largos períodos de tiempo protegidos del sistema inmune del individuo o de los antibióticos aplicados en los cultivos celulares (Yavlovich y cols., 2004). Otros estudios han demostrado que estas bacterias tienen una estructura, “tip organelle”, que les permite adherirse a la superficie de la célula hospedero sin necesariamente entrar en ella (Rottem, 2003). Casi todos los *Mycoplasma* (género de *Mollicutes* más frecuente contaminante de cultivos celulares) dependen de la adhesión a la célula hospedero para colonizar e infectar. En estos, la adhesión es el mayor factor de virulencia y por ende, los mutantes con deficiencias en este proceso son avirulentos (Razin y Jacobs, 1992).

### **Prevalencia en cultivos celulares**

Existen 20 especies conocidas de *Mollicutes* que afectan con mayor frecuencia a los cultivos de células, siendo 5 especies (*Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma orale* y *Acholeplasma laidlawii*) las más prevalentes

(Tang y cols., 2000; Uphoff y cols., 2005). Dado que son los del género *Mycoplasma* los más frecuentes, a menudo se hace referencia indistintamente a los *Mollicutes* como *Mycoplasmas*.

La mayoría de los *Mollicutes* son resistentes a los antibióticos comúnmente usados en cultivos celulares que requieren ser mantenidos por largos periodos (Rawadi y cols., 1995) como la Penicilina y la Estreptomicina. Además, al no ser visibles al microscopio óptico puede pasar mucho tiempo hasta su detección ya que no producen turbidez como muchas otras bacterias y hongos contaminantes (Uphoff y cols., 1992).

### **Fuentes de contaminación**

La fuente de contaminación más frecuente en cultivos celulares es el personal de laboratorio (puede extrapolarse también a aquellos encargados de tomar una biopsia) pues se ha aislado *M. orale*, *M. salivarum* y más raramente *M. fermentans* en el 25 – 80% de individuos sanos. Una técnica aséptica inadecuada puede llevar a la contaminación de los cultivos por uno de estos microorganismos. Sin embargo, la contaminación también puede deberse a que el cultivo estéril tomó contacto con células infectadas de otro cultivo, lo que implica también una mala manipulación por parte del trabajador (Hay y cols., 1989). Además, es preciso asegurar la calidad de los cultivos comerciales o de los que se reciben como colaboración de otro laboratorio ya que es posible que estén infectados. Los sueros comerciales utilizados para la preparación de medios de cultivo también pueden tener contaminantes como *M. arginini*, *Acholeplasma laidlawii* y *M. hyorhina* (Shahhosseiny y cols., 2010),

La tripsina, al ser obtenida de páncreas de cerdo, puede estar contaminada con *M. hyorhinis* (Razin y Hayflick, 2010). Lo ideal sería que todo el material que se utilice para cultivo celular esté irradiado y certificado de que está libre de *Mycoplasma*.

Debido a que los *Mollicutes* son tan pequeños y polimórficos, pueden pasar a través de los filtros comúnmente usados en cultivo celular de 450 y 220 nm para eliminar contaminantes, e incluso cuando se usa un método de filtración con alta presión, algunos *Mycoplasma* pueden atravesar los filtros con poros de 100 nm (Stanbridge, 1971; Hay y cols., 1989), contaminando así los medios de cultivo y otras soluciones.

### **Efectos sobre cultivos celulares**

La contaminación de cultivos celulares por *Mycoplasma* (haciendo referencia a *Mollicutes* de ahora en adelante en el proyecto) puede causar diversos efectos que pueden determinar resultados no confiables y para la industria biofarmacéutica, productos potencialmente dañinos (Hwang y cols., 2012).

De modo general, los efectos causados por *Mycoplasma* se deben a que esta bacteria compite con las células hospedero por precursores biosintéticos y nutrientes que pueden alterar la síntesis de DNA, RNA y proteínas, disminuye los niveles de aminoácidos y ATP en la célula hospedero, es capaz de modificar antígenos de la membrana plasmática de las células que infecta (Stanbridge, 1971) e introduce alteraciones cromosómicas que incluso pueden llevar a una transformación maligna o inmortalización (Zhang y cols., 2004).

Respecto del crecimiento celular y morfología, lo apreciable puede variar desde “ningún cambio” hasta el incremento en la granularidad citoplasmática, retardo en la proliferación y en algunos casos lisis de todo el cultivo.

Cabe mencionar algunos ejemplos con el propósito de resaltar la importancia de los efectos mencionados:

- En una investigación de la respuesta de células de adenocarcinoma mamario humano frente a 2 tratamientos diferentes, el hallazgo de *Mycoplasma* y el microarray realizado versus el grupo no infectado reveló que de un total de 22.000 genes detectados, al menos 200 estaban alterados, siendo up o “downregulados”. Estos genes comprendían citoquinas, receptores de membranas, proteínas transportadoras, genes de respuesta al estrés, canales iónicos, factores de crecimiento, oxidasas, supresores de tumor y oncogenes (Miller y cols., 2003).
- La infección crónica por *Mycoplasma* en una línea celular de monocitos humanos provocó una disminución considerable de la respuesta de estas células frente a los estímulos de los receptores *Toll-like*. Esta respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos pudo revertirse usando un tratamiento antibiótico (Zakharova y cols., 2010). Los *Mycoplasma* son capaces de estimular o suprimir linfocitos de manera no específica tanto *in vitro* como *in vivo*. Las moléculas derivadas de estas bacterias modulan la actividad de monocitos o macrófagos y de células “Natural Killer” gatillando la producción de una gran variedad de citoquinas y quimioquinas (Razin y cols., 1998).
- La presencia de *Mycoplasma* en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y en un estudio incrementó los niveles del inhibidor de calpaína, situación que resultó ser neuroprotectora ante los efectos tóxicos del péptido b-amiloide (Elkind y cols., 2011).

Estos ejemplos, entre muchos otros, sugieren que en algunos casos los resultados obtenidos de cultivos celulares contaminados con *Mycoplasma* (y en general con *Mollicutes*) podrían no ser confiables, dado el sinnúmero de alteraciones que provocan.

## **Detección**

Los métodos de detección para *Mycoplasma* (el género más frecuentemente detectado como contaminante de cultivos celulares) se pueden dividir en: convencionales y alternativos.

1. Métodos convencionales: incluyen el cultivo microbiológico y el ensayo en células reporteras.

1.1. El cultivo microbiológico permite detectar las especies de *Mycoplasma* cultivables, en medios o agares definidos. Lamentablemente este método es muy lento y demora aprox. 28 días, requiere un profesional entrenado que sepa evaluar los resultados y puede dar falsos negativos cuando la cantidad de contaminante se acerca al límite de detección de la técnica. Además, si la muestra se manipula de manera inadecuada, el riesgo de falsos negativos también aumenta puesto que se ha observado que los procedimientos de congelar y descongelar las muestras afectan la viabilidad de *Mycoplasma* (Cheng y cols., 2007). Finalmente, como no existe un medio estándar para el cultivo de *Mycoplasma*, pueden haber muchas especies que estén contaminando efectivamente las células, pero que no crecerán al ser sembradas.

- 1.2. El ensayo en células reporteras se utiliza con el propósito de detectar las especies de *Mycoplasma* no cultivables. Se basa en el uso de cultivos celulares de mamíferos (usualmente células Vero) que soportan el crecimiento de estas especies “fastidiosas”. Luego de cultivarlas, se tiñen con un fluorocromo que se une al DNA (como por ejemplo Hoescht) y eso revelará las bacterias unidas a la membrana externa mediante un microscopio de fluorescencia. Este método también requiere un profesional capacitado para identificar contaminaciones como ésta ya que es una tinción poco específica.
  
2. Métodos alternativos: incluyen detección de ácidos nucleicos, ensayos enzimáticos y uso de líneas celulares recombinantes.
  - 2.1. Los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos (PCR de tiempo final, touchdown, RT-PCR o PCR tiempo real) tienen como ventaja principal que permiten un resultado rápido, específico para la secuencia objetivo y altamente sensible. Sin embargo, una desventaja que presentan todos los métodos basados en la detección de DNA genómico es que no pueden diferenciar entre *Mycoplasma* viables o no.
    - 2.1.1. El PCR de tiempo final (o PCR convencional) es fácil de implementar, es una técnica no costosa, con resultados en pocas horas y será altamente específica y sensible dependiendo principalmente de los primarios utilizados y la cantidad de DNA genómico presente en la muestra.
    - 2.1.2. El Touchdown-PCR se puede utilizar como una opción para disminuir el alineamiento inespecífico sobretodo cuando se utilizan primarios degenerados

diseñados para abarcar todas las variaciones genéticas posibles entre las especies. Su eficiencia se ha demostrado en estudios recientes (Hecker y Roux, 1996).

2.1.3. Los RT-PCR (PCR con Transcriptasa Reversa) surgen como una opción interesante entre todas las mencionadas porque su objetivo, los transcritos de rRNA 16S, están presentes en 100 -1000 copias en una bacteria de *Mycoplasma* (Peredeltchouk y cols., 2010), en contraste con el gen 16S que sólo se presenta en 1 o 2 copias (Razin y cols., 1998), lo que resulta en una sensibilidad 100 veces mayor en comparación con los PCR convencionales (Peredeltchouk y cols., 2010). Además se ha observado que los métodos basados en transcripción reversa de RNA son más adecuados para monitorear la viabilidad de las bacterias (Cenciarini-Borde y cols., 2009). La única limitante de esta técnica es su alta dependencia del operador ya que requiere de muchos pasos previos a la amplificación final lo que implica mayor manipulación de la muestra. Además, si no se poseen los insumos necesarios, la extracción de RNA es más costosa y compleja.

2.1.4. El PCR tiempo real tiene la ventaja de permitir analizar la curva de disociación de los amplificadores. Esto es especialmente útil para verificar la autenticidad del producto de PCR. Además, la manipulación de la muestra luego de amplificar es nula, lo que disminuye el riesgo de contaminación entre las muestras.

2.1.5. Existen también *microarrays* que permiten no sólo detectar sino también identificar en una reacción, diversas especies de *Mycoplasma* en base a

hibridación de secuencias específicas del genoma de éstos con sondas diseñadas artificialmente (Volokhov y cols., 2007).

2.2. Los ensayos enzimáticos se basan en medir la actividad de enzimas específicas de *Mollicutes*. Para estas bacterias, la generación de ATP se produce principalmente vía fermentación de carbohidratos y arginina, con la excepción de *Ureaplasma* que obtiene su energía de la hidrólisis de la urea. Ya que el ATP es la base del sistema energético de los *Mollicutes*, es un proceso constante que puede ser detectado en cualquier momento y puede medirse como la actividad de enzimas acetato kinasa y carbamato kinasa, que convierten ADP en ATP en presencia de sustratos acetil o carbamil-fosfato. Esta conversión puede ser detectada por un luminómetro si se utiliza luciferasa y es un ensayo barato, sensible, simple, práctico y rápido para testear contaminación por *Mycoplasma*, aunque no es específico (Mariotti y cols., 2008).

2.3. Los ensayos con líneas celulares recombinantes se basan en que las lipoproteínas de *Mycoplasma* interactúan con el receptor tipo Toll 2 e inducen una secreción de fosfatasa alcalina en una línea celular HEK293 transfectoma (Huang y cols., 2009). Esta secreción (más bien su actividad) se puede detectar usando un método colorimétrico. Lamentablemente este test también es inespecífico.

Por todo lo expuesto, por lo general, se prefieren los ensayos que detectan ácidos nucleicos como PCR convencional por la facilidad con que se pueden implementar, por su especificidad, sensibilidad y porque en su mayoría no son muy costosos.



## **Tratamiento**

En cuanto a los tratamientos existentes, siempre se ha recomendado desechar las placas contaminadas con esta bacteria como primera opción por el riesgo que implica su mantención junto a otros cultivos y la posibilidad de contaminación del entorno en el laboratorio. Debido a que carecen de pared celular, no son sensibles a antibióticos como la penicilina, sino más bien a otros que inhiben su multiplicación teniendo por lo tanto un efecto bacteriostático. Además, el patrón de susceptibilidad antibiótica puede variar de acuerdo al origen de la contaminación, por ejemplo, el patrón de un *Mycoplasma* que ha estado en cultivo celular sometido por largos períodos a distintos antibióticos puede ser notoriamente diferente a otro que es netamente de origen animal o humano. Por lo tanto, si bien se puede adecuar el tratamiento antibiótico de acuerdo a la especie de *Mollicutes* que se trate, los *Mycoplasma* pueden adquirir fácilmente resistencia a los antibióticos aplicados, por eso se recomienda no tratarlos si no es estrictamente necesario (Taylor-Robinson y cols., 1997). En caso de que los cultivos celulares no puedan desecharse, existen antibióticos disponibles en el mercado que aseguran eliminar *Mycoplasma* en un periodo que puede variar entre 2 a 3 semanas. Esta solución es lenta y la ausencia de DNA genómico contaminante debe probarse periódicamente con un método para detectar *Mycoplasma* una vez terminado el tratamiento.

## **Prevención**

De modo general, dentro de las acciones a realizar para prevenir la contaminación por *Mollicutes* se encuentra una buena técnica aséptica al momento de trabajar con placas de cultivo y biopsias (el uso de mascarilla al obtenerlas es fundamental). Se puede utilizar irradiación gama de los sueros comerciales para cultivo (Nims y cols., 2011), filtros

menores de 220 nm para todas las soluciones de cultivo celular y luz UV para descontaminar la zona previo al trabajo en la cámara de cultivo. Se ha demostrado que esto último más el uso de alcohol 70% por 5 minutos elimina efectivamente la contaminación existente en las superficies de trabajo (Eterpi y cols., 2010).

Es preciso de todas maneras establecer ciertas normas para evitar la contaminación tanto de *Mollicutes* como de otros microorganismos (Held, 2007):

- El factor humano es fundamental, a menudo los operadores cometen errores de asepsia cuando están estresados, con sobrecarga de trabajo, cuando no son correctamente capacitados o simplemente por distracción. Para evitar esto, deben hacerse cada cierto tiempo reuniones para recordar las buenas técnicas asépticas en cultivo celular.
- El operador debe minimizar la posibilidad de transportar agentes contaminantes en su cabello, piel, ropa (debe usar ropa exclusiva para el trabajo con células) e incluso debe evitar hablar mientras trabaja.
- Limpiar siempre con un desinfectante la superficie de trabajo y los insumos y reactivos que se utilizarán. Además, trabajar con una línea celular y sus respectivos medios en la cámara de cultivo para evitar contaminación cruzada.
- Cada cierto tiempo y de forma regular debe hacerse un aseo profundo a toda la cámara de cultivo, incluyendo superficies anexas y equipos como refrigeradores, estufas, centrifugas, estantes, entre otros.
- La cámara de flujo laminar debe permanecer encendida para mantener el flujo de aire a menos que no se vaya a utilizar por un período extenso de tiempo.
- Deben evitarse los flujos de aire turbulentos reduciendo al mínimo el personal que trabaja en la cámara de cultivo celular simultáneamente.

- Alicuotar medios de cultivo y soluciones para cada línea celular, rotulándolos correctamente para evitar confusión.
- Debe testearse la presencia de *Mollicutes* en todas las soluciones, medios y células de cultivo periódicamente con el o los métodos que se hayan estandarizado en el laboratorio.
- Las células y los medios de cultivo, antes de su uso, deben ser testeados para asegurar que estén libres de *Mollicutes* con el o los métodos que se hayan estandarizado en el laboratorio. Hasta su detección, deben estar separados del resto de las soluciones del laboratorio.
- Se debe evitar trabajar con una línea celular por un período prolongado ya que se expone a un mayor riesgo de contaminación. En su lugar, debe descongelarse un nuevo vial del stock existente y congelar el que está en uso, antes cerciorándose de que sea negativo para *Mollicutes*.
- Usar los antibióticos con medida, puesto que si bien pueden ayudar a prevenir las contaminaciones bacterianas visibles al microscopio óptico, si se usan en exceso pueden enmascarar una mala técnica aséptica y promover el desarrollo de resistencias incluso a los antibióticos dirigidos contra *Mollicutes*.

Finalmente, cada laboratorio debiera chequear regularmente si está trabajando bajo condiciones que permiten resultados confiables asegurando la no presencia de *Mollicutes* en sus cultivos celulares. Este trabajo pretende establecer una técnica de biología molecular para detectarlos y posteriormente eliminarlos usando antibióticos o luz UV dependiendo del material que esté contaminado.

## **HIPÓTESIS**

La contaminación por *Mollicutes* en cultivos celulares es detectable por PCR convencional y puede ser eliminada con luz UV en los medios de cultivo o tratamiento antibiótico en cultivos celulares.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Implementar la técnica de PCR convencional para la detección de *Mollicutes* en cultivos celulares y evaluar el uso de luz UV y tratamientos antibióticos para su eliminación.

### **Objetivos específicos:**

1. Estandarizar un PCR convencional para detectar *Mollicutes* en cultivos celulares.
2. Probar el uso de luz UV como método para eliminar la contaminación por *Mollicutes* de todas las soluciones utilizadas en cultivo.
3. Comparar la efectividad de curación de distintos tratamientos antibióticos para *Mycoplasma* disponibles en el mercado: Biomyc 1, Biomyc 2, Biomyc 3 y Primocin a través del tiempo, la duración de su actividad una vez terminado el tratamiento y el comportamiento celular ante la exposición a estos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Cultivos celulares**

Los fibroblastos humanos (JF002) y de ratón (MEF) se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's Medium High Glucose (DMEMh) suplementado con 10% Suero Bovino Fetal, 1X Aminoácidos no esenciales y 1X Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B. La línea celular de neuronas de rata (RC NQ7) se cultivó en medio DMEM-HAM F12 suplementado con 10% Suero Bovino Adulto, 2,5% Suero Bovino Fetal y 1X Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B. Todas las células fueron cultivadas en una placa de 24 pocillos.

### **Uso de luz UV**

Como medida adicional al programa de control de contaminación, se determinó mediante PCR si los medios de cultivo (DMEMh y DMEM-HAM F12) o los sueros comerciales (Suero Bovino Adulto y Suero Bovino Fetal) estaban contaminados con *Mollicutes*. Una alícuota de los medios de cultivo y los sueros comerciales fueron irradiados con luz UV por 15 minutos y se evaluó si existía o no presencia de DNA de *Mollicutes* mediante un PCR convencional usando como control una alícuota de las soluciones previo a la irradiación. Si el resultado era que la luz UV degrada completamente el DNA contaminante de *Mollicutes*, podría implementarse este paso como una acción adicional a todo el programa de control de contaminación del laboratorio.

### **Extracción de DNA genómico**

Se extrajo DNA genómico de 500 uL de todas las soluciones utilizadas para cultivar las células antes de comenzar a utilizarlas mediante el kit E.Z.N.A.® Blood DNA Kit (Omega

Bio-tek Inc.), previa concentración por centrifugación 20 minutos a 16.000 g. A su vez se extrajo mediante la misma técnica, DNA genómico de 500 uL sobrenadante de células antes de iniciar el tratamiento antibiótico, al final de cada semana ya iniciado éste (3 semanas en total) y después de 2 semanas de terminado el tratamiento.

Todas las muestras a las cuales se les extrajo DNA genómico fueron cuantificadas en Nanodrop para determinar la cantidad de ng/uL de DNA genómico obtenido.

## PCR

Se detectó la presencia de *Mollicutes* a través de un PCR dirigido a una región conservada del gen 16S rRNA (GenBank Accession: X64727.1) utilizando los partidores descritos por van Kuppeveld y cols. que amplifican un segmento de 270 pb (van Kuppeveld y cols., 1992). Esta reacción permite hacer un screening amplio de las especies de *Mollicutes* que representan una óptima selección en términos de frecuencia de contaminación de cultivos celulares: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. pneumoniae* y *M. gallisepticum* (Young y cols., 2010).

La secuencia de los partidores es la siguiente:

FW MGSO 5'-TGCACCATCTGTCACCTCTGTAAACCTC-3'

RV GPO-3 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'.

Antes de utilizarlos se hizo un análisis BLAST que aseguró que estos partidores no alineaban con secuencias de las especies utilizadas en los cultivos celulares de este estudio (*Homo sapiens*, *Rattus rattus*, *Mus musculus*), tal que son específicos para *Mollicutes* y no hay alineaciones inespecíficas con las especies hospederas.

Se usó como control negativo el DNA extraído de 500 uL de Suero Fetal Bovino (Biological Industries, Israel) cuyo proveedor asegura que está certificado como libre de *Mycoplasma*. El control positivo fue DNA extraído de 500 uL de sobrenadante de una línea celular contaminada (RC RETRO) y enviado al Laboratorio de Comunicaciones Celulares de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile para su confirmación mediante PCR, el cual detecta las 5 especies más prevalentes de *Mollicutes* además de *Acholesplasma* y *Spiroplasma*. Ambos controles fueron cuantificados por espectrofotometría a 260 nm (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments, Inc.).

El *mix* de reacción para las reacciones de PCR contenía 2,5 uL Reaction Buffer 10X MgCl<sub>2</sub> Free (Biotools, Sao Paulo, SP, Brasil), 4.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 uM dNTPs, 0,25 uM de cada partidor GPO-3/MGSO (Integrated DNA Technologies), 1 U Taq DNA polymerase (Biotools, Sao Paulo, SP, Brasil) -según las recomendaciones del fabricante-, 10 uL de DNA templado y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 25 uL.

#### *Temperatura de Alineamiento*

Se hizo un PCR con gradiente de temperatura de 2°C desde 55°C hasta 63°C (considerando que GPO-3 alinea a 58°C y MGSO a 60°C) para determinar la temperatura a la cual se observaba más claramente el producto de 270 pb utilizando como muestra el control positivo validado. El protocolo consistió en una denaturación inicial de 10 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, Temperatura de Alineamiento por 40 segundos, 72°C por 60 segundos y finalizando con una extensión de 10 minutos a 72°C (Adaptado de Young y cols., 2010) en un termociclador Swift™ Maxi Thermal Cycler SWT- MX-BLC-7 (ESCO Technologies). Una vez determinada la temperatura de alineamiento ideal, se trabajó con ella para todas las futuras reacciones.

### *Sensibilidad analítica de la técnica*

Se hizo una dilución seriada desde 3 ng/uL hasta 0,0000384 ng/uL del control positivo (cuantificado por espectrofotometría a 260 nm) para determinar el límite de detección de la técnica de PCR mencionada.

### *Especificidad de la técnica*

Se probó la especificidad de los partidores utilizados haciendo un PCR con 2 especies que son contaminantes frecuentes de cultivo celular: *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus cereus* (Mirjalili y cols., 2005); y con *Escherichia coli*, puesto que es la especie bacteriana más usada en el laboratorio donde se realizó este trabajo.

Para visualizar el producto de PCR, se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1,5% p/v con bromuro de etidio y se cargaron 15 uL de muestra por pocillo. El gel se corrió a 100 Volts por 60 minutos y se observó a través de un transiluminador. Se consideró que una muestra era positiva para *Mollicutes* si presentaba un producto amplificado de 270 pb.

### **Tratamiento antibiótico**

Existen diversos tratamientos antibióticos disponibles comercialmente para el tratamiento de *Mycoplasma*. En este caso se usó Biomyc 1, Biomyc 2, Biomyc 3 (Biological Industries, Israel) y Primocin (Invivogen, San Diego, USA) para cada tipo celular con 4 protocolos diferentes. Cada protocolo se aplicó por triplicado en cada cultivo celular de fibroblastos humanos, de ratón y neuronas de rata, todos contaminados por lo menos 6 meses antes de comenzar este trabajo.



Biomyc 1 (Biological Industries, Israel) contiene el antibiótico tiamulina, un bacteriostático. Inhibe directamente la generación de la cadena peptídica uniéndose a la subunidad ribosomal 50S e interfiriendo con la actividad peptidil transferasa.

Biomyc 2 (Biological Industries, Israel) contiene minociclina, un bacteriostático. Interfiere la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad ribosomal 30S, impidiendo la unión del tRNA con el completa mRNA-ribosoma.

Biomyc 3 (Biological Industries, Israel) contiene el antibiótico ciprofloxacino, un bactericida. Inhibe la DNA girasa (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV, las que son necesarias para la replicación del DNA, transcripción, reparación y recombinación. Muchas especies de *Mycoplasma* han demostrado ser sensibles a este antibiótico según el fabricante, tales como *A. laidlawii*, *M. orale*, *M. hyorhinis*, *M. fermentans* y *M. arginini*.

Primocin (Invivogen, San Diego, USA) es una mezcla de antibióticos y antifúngicos no especificada que bloquea la síntesis de DNA y proteínas, actuando como bactericida. En bacterias, su blanco es la enzima DNA girasa y las subunidades ribosomales 30S y 50S. El blanco fúngico es el ergosterol, una molécula que se encuentra formando parte de las membranas celulares de hongos y levaduras.

Tratamientos				
Semana 1	Biomyc 1 – 4 días	Biomyc 3 con cambio de medio cada 3 días	Biomyc 1 – 4 días	Primocin 1:1000 con cambio de medio cada 3 días
	Biomyc 2 – 3 días		Biomyc 2 – 3 días	
Semana 2	Biomyc 1 – 4 días		Biomyc 1 – 4 días	
	Biomyc 2 – 3 días		Biomyc 2 – 3 días	
Semana 3	Biomyc 1 – 4 días		Biomyc 3 con cambio de medio cada 3 días	
	Biomyc 2 – 3 días			

**Tabla N°1.** Protocolos de tratamientos antibióticos utilizados.

### **Análisis Estadístico**

A los resultados de los tratamientos antibióticos se aplicó el test exacto de Fisher para evidenciar el cambio, en los distintos tiempos, de la presencia o ausencia de DNA de *Mollicutes* en cada tipo celular.

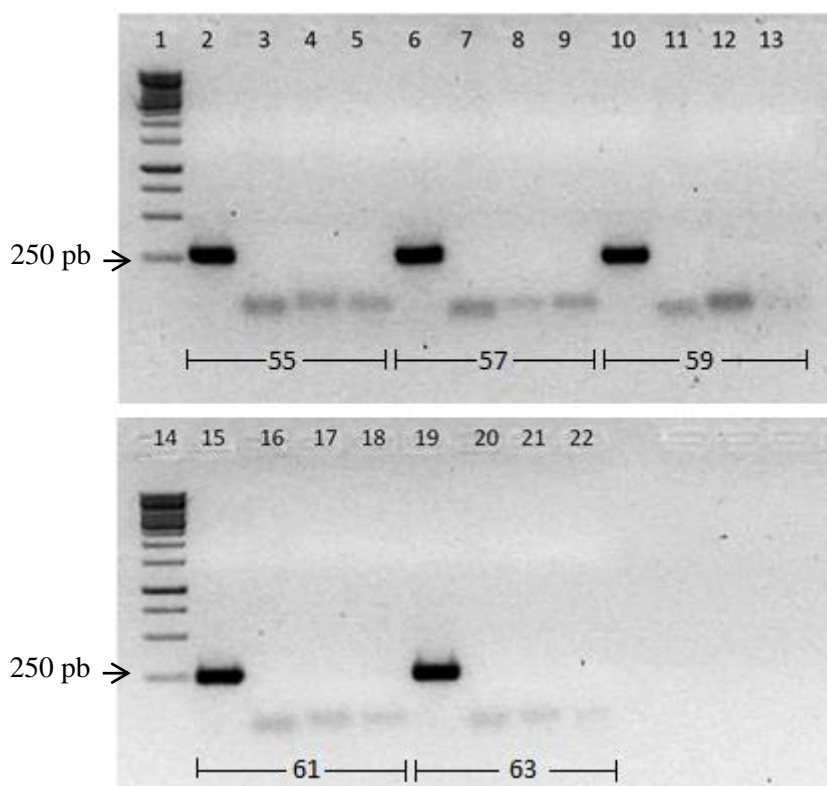
Se comparó Biomyc 3 y Primocin cada semana a través de un PCR para determinar si existieron diferencias significativas entre ellos en la efectividad de curación, puesto que ambos son bactericidas. Después de terminado los tratamientos antibióticos se mantuvieron las células por 2 semanas y en ese momento se compararon los 4 protocolos utilizados (Tabla 1).

Se utilizó como control cada cultivo respectivo contaminado (sin tratamiento antibiótico).

## RESULTADOS

### *Determinación de la temperatura de alineamiento*

Para comenzar la estandarización de la reacción de PCR, se probaron diferentes temperaturas de alineamiento que cubrieron desde  $T_m-3^{\circ}\text{C}$  del partidador que alineaba a menor temperatura (GPO-3 =  $58^{\circ}\text{C}$ ), hasta  $T_m+3^{\circ}\text{C}$  del partidador que alineaba a mayor temperatura (MGSO =  $60^{\circ}\text{C}$ ). Se pudo determinar que la temperatura de alineamiento ideal para la reacción de PCR es  $63^{\circ}\text{C}$ , puesto que incluso se forma menor cantidad de dímeros de partidores (figura 1).



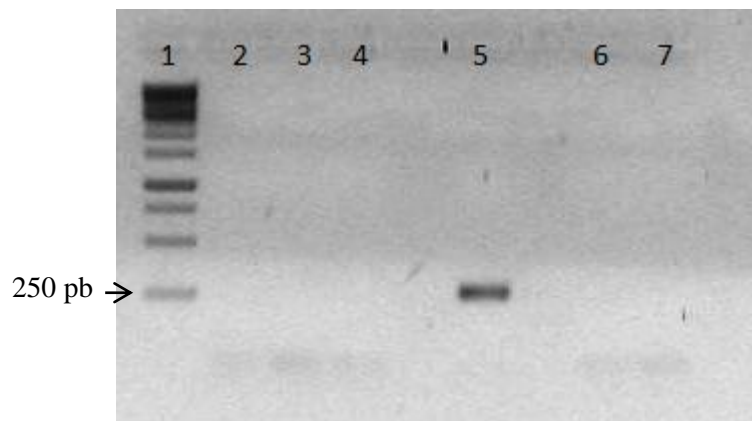
**Figura 1.** Estandarización de PCR para *Mollicutes* a distintas temperaturas de alineamiento. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio.

El fragmento considerado positivo es de 270 pb. Carril 1 y 14: Marcador de tamaño molecular 1 kb (GeneRuler™); Carril 2, 6, 10, 15 y 19: Control positivo; Carril 3, 7, 11, 16 y 20: Control negativo; Carril 4, 8, 12, 17 y 21: Control de agua; Carril 5, 9, 13, 18 y 22: Control de *mix*.

En adelante y para las siguientes reacciones de PCR, se utilizó 63°C como la temperatura de alineamiento para los 35 ciclos.

### *Especificidad del PCR*

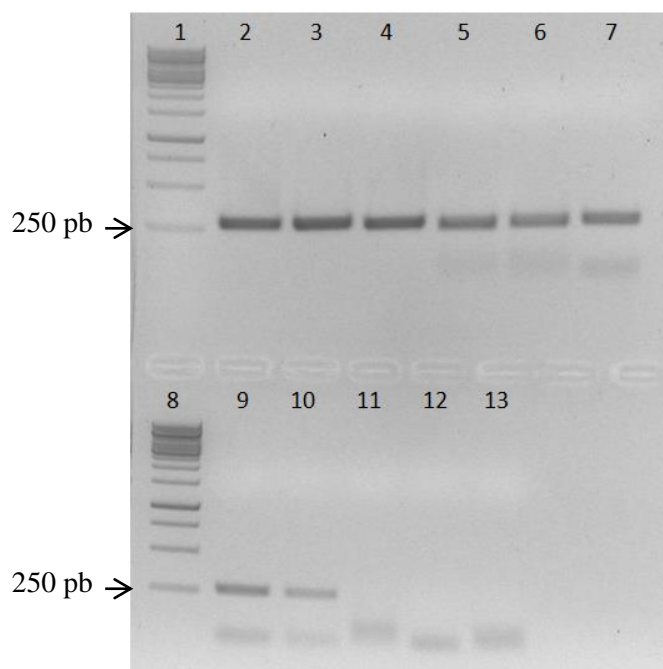
Para asegurar que los partidores fuesen específicos para el 16S rRNA de *Mollicutes*, se hizo un PCR con muestras de DNA genómico de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli* (esta última por ser una especie muy trabajada en el laboratorio) y se pudo concluir que no hubo amplificación con estas especies, lo que demuestra la especificidad de la reacción.



**Figura 2.** . Estudio de especificidad del PCR para detectar *Mollicutes*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio. El fragmento considerado positivo es de 270 pb. Carril 1, Marcador de tamaño molecular 1 kb (GeneRuler™); Carril 2, *B. cereus*; Carril 3, *S. epidermidis*; Carril 4, *E. coli*; Carril 5, Control positivo; Carril 6, Control negativo; Carril 7, Control de *mix*.

### *Sensibilidad del PCR*

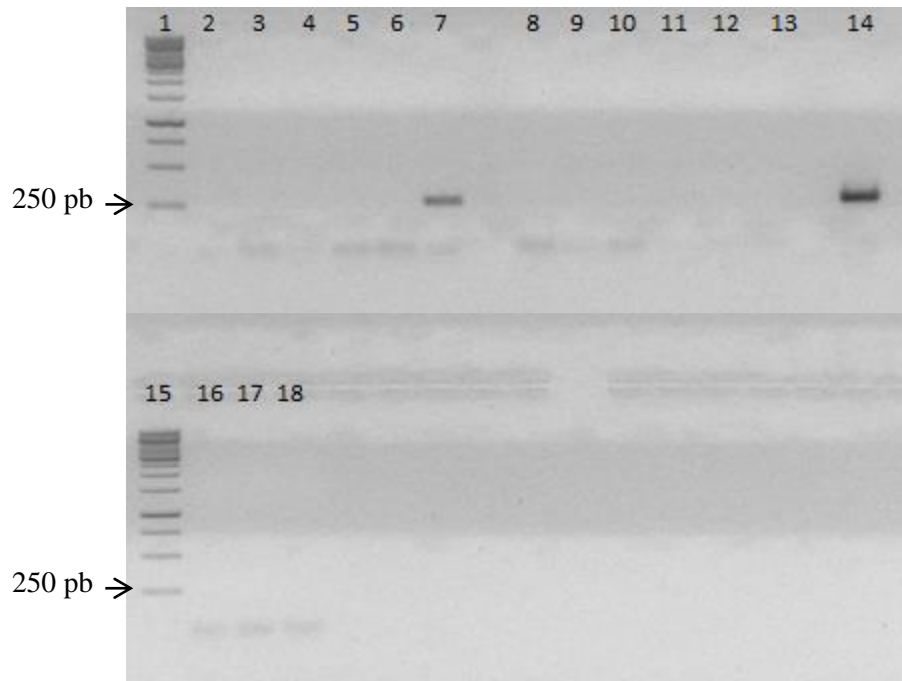
Posteriormente se detectó la sensibilidad de la técnica diluyendo seriadamente una concentración de 3 ng/uL de DNA genómico del control positivo usando un factor de dilución 1:5. La reacción de PCR demostró ser altamente sensible pues a concentraciones tan pequeñas como 0,0000384 ng/uL, aún se observa una banda claramente distinguible (figura 3).



**Figura 3.** Estudio de sensibilidad de la técnica de PCR de *Mollicutes*. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio. El fragmento considerado positivo es de 270 pb. Carril 1 y 8: Marcador de tamaño molecular 1 kb (GeneRuler™); Carril 2, 3 ng/uL; Carril 3, 0,6 ng/uL; Carril 4, 0,12 ng/uL; Carril 5, 0,024 ng/uL; Carril 6, 0,0048 ng/uL; Carril 7, 0,00096 ng/uL; Carril 9, 0,000192 ng/uL; Carril 10, 0,0000384 ng/uL; Carril 11, Control negativo; Carril 12, Control de agua; Carril 13, Control de *mix*.

### *Contaminación en soluciones de cultivo celular y uso de luz UV*

Mediante PCR se pudo determinar que sólo el suero bovino adulto que se utilizaría para hacer los medios de cultivo celular estaba contaminado con *Mollicutes*. Luego de la exposición a luz UV por 15 minutos, la muestra fue negativa por PCR (figura 4).



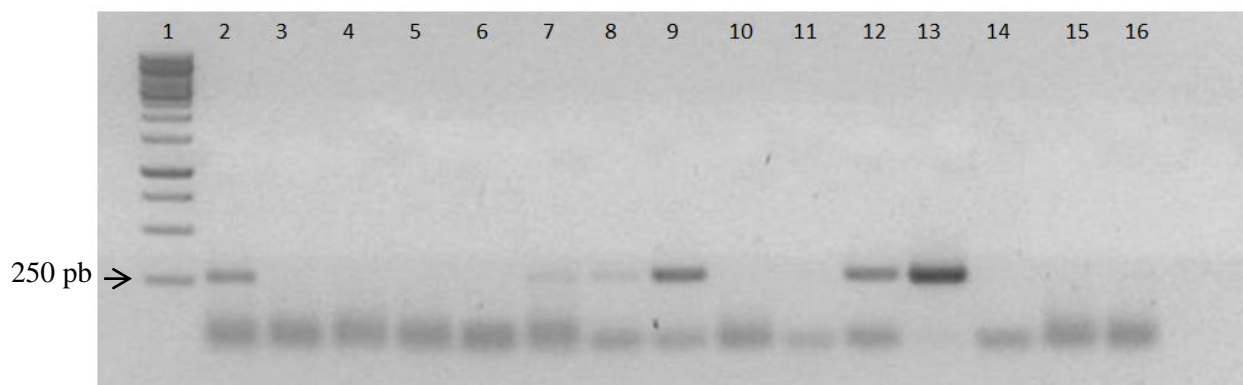
**Figura 4.** Estudio de presencia de *Mollicutes* en las soluciones pre y post exposición a luz UV. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio.

El fragmento considerado positivo es de 270 pb. Carril 1 y 15: Marcador de tamaño molecular 1 kb (GeneRuler™); Carril 2, Medio DMEM-F12; Carril 3, Medio DMEMh; Carril 4, PBS; Carril 5, Tripsina; Carril 6, Suero Bovino Fetal; Carril 7, Suero Bovino Adulto; Carril 8, Medio DMEM-F12 UV; Carril 9, Medio DMEMh UV; Carril 10, PBS UV; Carril 11, Tripsina UV; Carril 12, Suero Bovino Fetal UV; Carril 13, Suero Bovino Adulto UV; Carril 14, Control positivo; Carril 16, Control negativo; Carril 17, Control de agua; Carril 18, Control de *mix*.

### *Tratamientos antibióticos*

A modo de resumen de los resultados obtenidos mediante PCR para cada tipo celular y tratamiento, se presenta a continuación la electroforesis de cada tipo celular (JF002, RCNQ7 y MEF) pre-tratamiento y 2 semanas post-tratamiento con el fin de observar la descontaminación esperada (figura 5). Lamentablemente, una semana después de haber iniciado el tratamiento antibiótico para JF002, las células se desprendieron de los pocillos y no quedó cantidad suficiente para que mantuvieran su proliferación a través del tiempo por lo que el cultivo se perdió y sólo se obtuvieron resultados de la primera semana.

Así mismo, la presencia y ausencia del DNA de *Mollicutes* en cada cultivo celular antes del tratamiento antibiótico y posterior a éste se resume en la figura 6.



**Figura 5.** Resultados pre y post tratamiento antibiótico de los 3 cultivos celulares expuestos. Electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio.

El fragmento considerado positivo es de 270 pb. Carril 1: Marcador de tamaño molecular 1 kb (GeneRuler™); Carril 2, RCNQ7 pre-tto.; Carril 3, Biomyc 1-2 2PT; Carril 4, Biomyc 3 2PT; Carril 5, Biomyc 1-2-3 2PT; Carril 6, Primocin 2 PT; Carril 7, MEF pre-tto.; Carril 8, Biomyc 1-2 2PT; Carril 9, Biomyc 3 2PT; Carril 10, Biomyc 1-2-3 2PT; Carril 11, Primocin 2 PT; Carril 12, JF002 pre-tto.; Carril 13, Control positivo; Carril 14, Control negativo; Carril 15, Control de agua; Carril 16, Control de *mix*.

Pre-tto = Pre-tratamiento; 2PT = 2 semanas post tratamiento.

	Biomyc 1 – 2				Biomyc 3			
	1	2	3	2 PT	1	2	3	2 PT
RCNQ7	+	-	-	+	-	-	+	+
	+	-	-	-	-	-	+	+
	+	-	-	-	+	+	+	-
MEF	-	-	+	+	-	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	+	+
	-	-	+	+	-	-	-	+
JF002	-				-			
	-				-			
	+				-			

	Biomyc 1 - 2 – 3				Primocin			
	1	2	3	2 PT	1	2	3	2 PT
RCNQ7	+	-	+	-	+	+	+	+
	+	-	+	+	+	+	+	+
	+	+	-	-	+	+	+	-
MEF	-	-	+	+	+	+	+	+
	-	-	+	+	-	+	+	+
	-	-	+	-	+	+	+	-
JF002	-				-			
	-				-			
	+				+			

**Figura 6.** Tabla resumen de la presencia y ausencia de DNA de *Mollicutes* mediante PCR, por tratamiento en cada cultivo celular (RCNQ7, MEF y JF002) a través del tiempo.

+ = DNA presente; - = DNA ausente; 2 PT = 2 semanas post-tratamiento.

El análisis estadístico mediante el test exacto de Fisher no mostró diferencias significativas en el número de cultivos descontaminados por cada tratamiento antibiótico para cada tipo celular, siendo todos los p-value obtenidos mayores a 0,05. Si bien se comparó sólo Biomyc 3 y Primocin las dos primeras semanas, a pesar de incluir Biomyc 1-2-3 al análisis de la tercera semana de tratamiento y de comparar finalmente todos los protocolos, no hubo

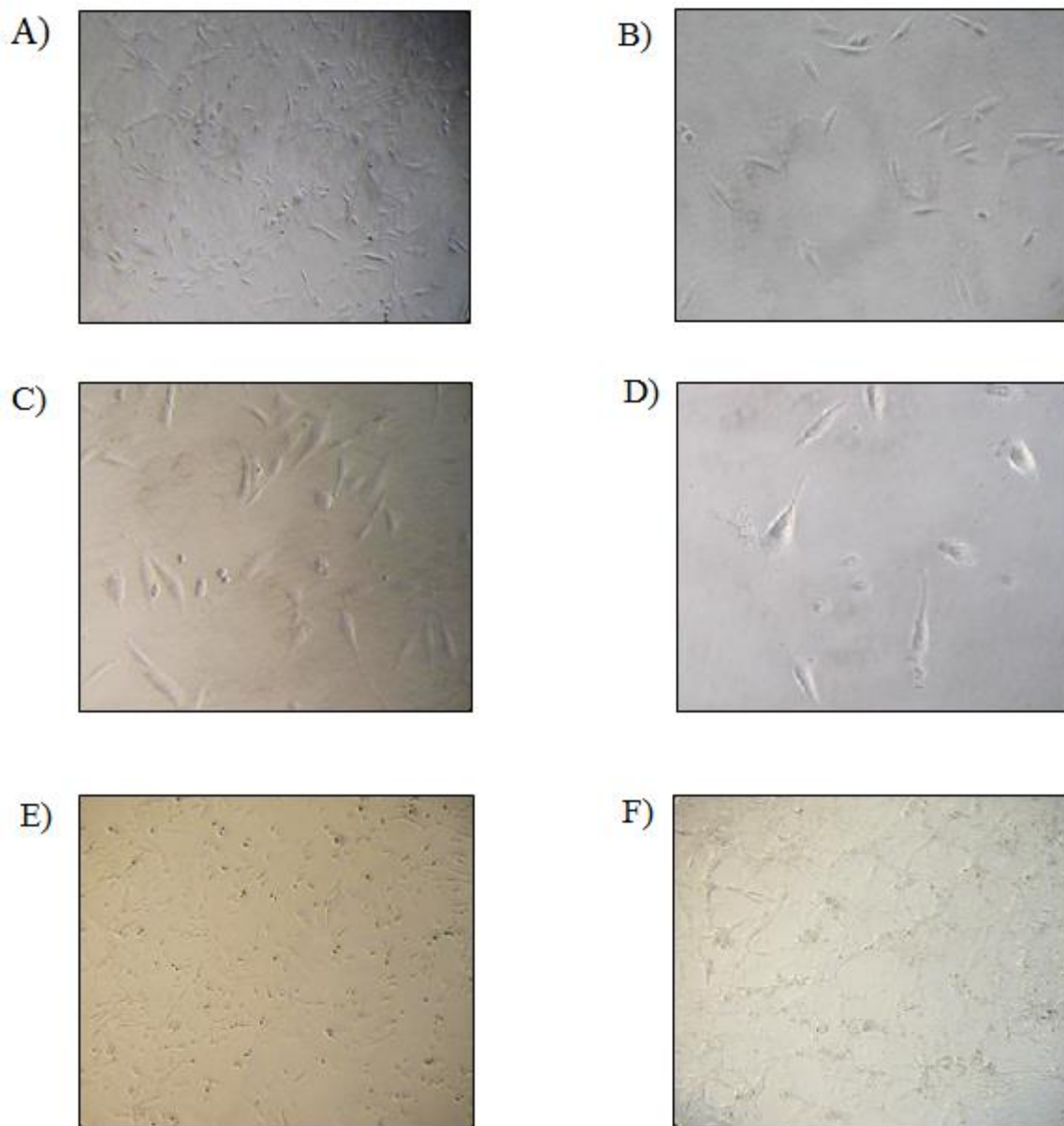


evidencia suficiente para poder afirmar que la proporción de descontaminaciones (ausencias de DNA) generada por cada tratamiento era distinta a los otros protocolos aplicados a través del tiempo para cada tipo celular.

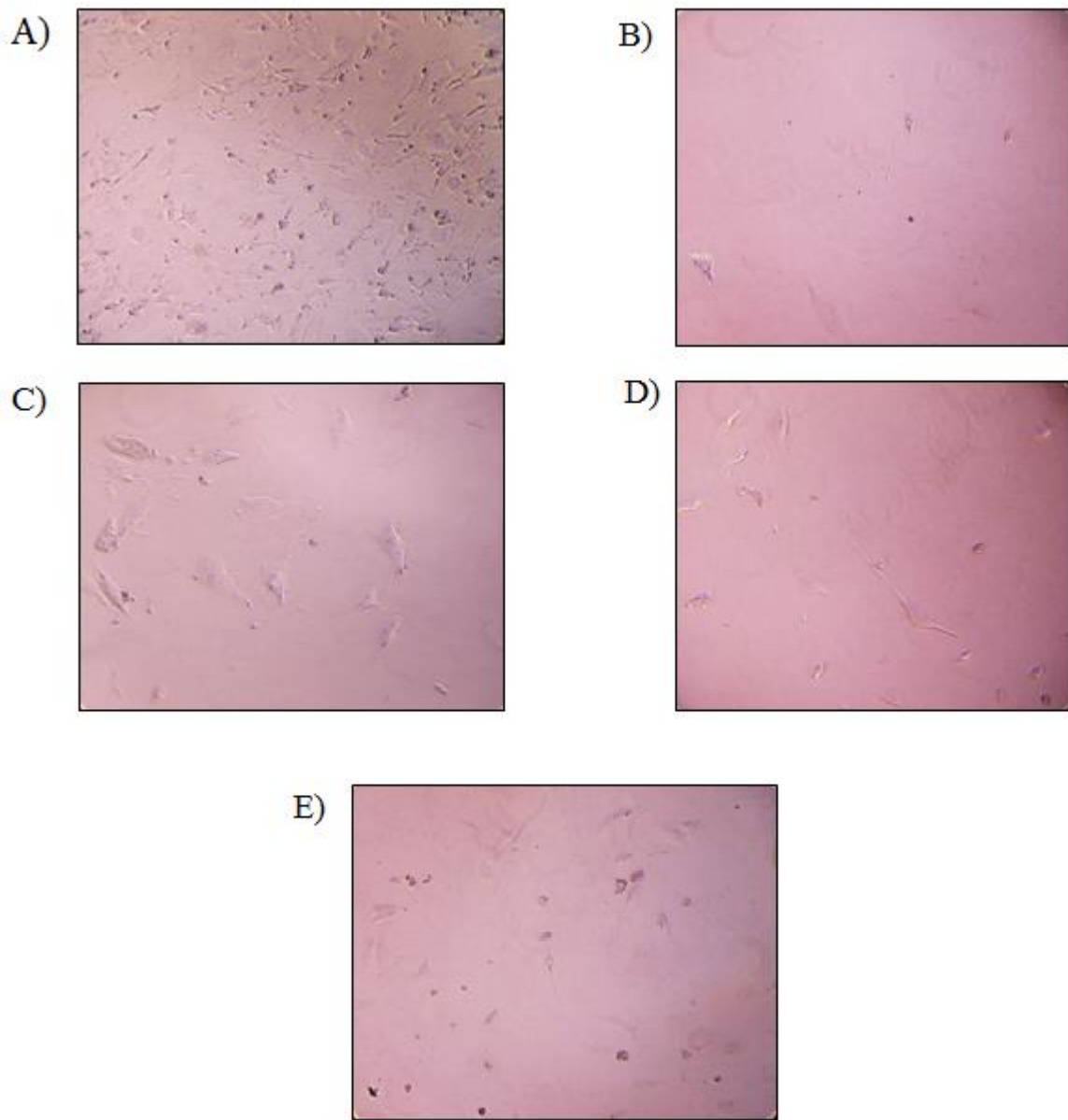
### *Comportamiento celular*

En cuanto al comportamiento de las células, se observaron similitudes en RCNQ7 y MEF frente a la exposición a los diversos tratamientos: con Biomyc 1–2 disminuyó considerablemente la cantidad de células por cada pocillo a través del tiempo; con Biomyc 3 hubo una disminución pero fue menos notoria que la anterior y con Biomyc 1–2–3 se observó una disminución de la cantidad de células similar al primer tratamiento mencionado (figura 7 y 8). Con Primocin no hubo disminución considerable en los pocillos de RCNQ7 expuestos a este tratamiento, siendo muy similar al control, en cantidad de células, durante las 3 semanas de tratamiento. MEF mostró un comportamiento diferente con Primocin al perder más cantidad de células que el control a través del tiempo, al igual que el efecto que causaron los otros tratamientos antibióticos (figura 8).

Sin embargo, la recuperación de la proliferación en los cultivos luego de terminado los diferentes tratamientos antibióticos fue muy diferente. RCNQ7 proliferó de manera normal en cuanto a cantidad y velocidad en todos los pocillos independiente del protocolo aplicado, en cambio MEF no volvió a proliferar en ninguno de sus pocillos, sino que la pérdida de células en los respectivos lavados de cada semana fue constante y progresiva, hasta quedar muy pocas células en cada pocillo.



**Figura 7.** Fotografías de RCNQ7 en cultivo. A) Pre-tratamiento. B) Biomyc 1-2, 3 semanas de tratamiento. C) Biomyc 3, 3 semanas de tratamiento. D) Biomyc 1-2-3, 3 semanas de tratamiento. E) Primocin, 3 semanas de tratamiento. F) 2 semanas post-tratamiento.



**Figura 8.** Fotografías de MEF en cultivo. A) Pre-tratamiento. B) Biomyc 1-2, 3 semanas de tratamiento. C) Biomyc 3, 3 semanas de tratamiento. D) Biomyc 1-2-3, 3 semanas de tratamiento. E) Primocin, 3 semanas de tratamiento.

## DISCUSIÓN

La técnica de PCR estandarizada para detectar *Mollicutes* resultó ser altamente sensible y específica, aunque sería interesante utilizar paralelamente otra técnica que permita evaluar la viabilidad de los *Mollicutes* detectados con el fin de correlacionar la detección de DNA genómico con los *Mollicutes* que efectivamente estén infectando el cultivo. Según la FDA, los únicos procedimientos aprobados para detección son el cultivo en agar y la tinción de Hoescht en paralelo, pero ya se mencionó anteriormente que las limitaciones de estos métodos hacen necesario buscar otras alternativas.

En cuanto al uso de luz UV, se pudo observar que fue realmente efectiva para eliminar el DNA genómico de *Mollicutes* presente en el suero bovino adulto, lo que permitiría implementar su uso como medida adicional a las buenas prácticas de asepsia en cultivo celular con el objetivo de erradicar cualquier contaminación que no haya sido previamente detectada. A partir de esto se desprende que es muy importante revisar las características de los sueros comerciales e insumos tales como tripsina o medios de cultivo que se utilizarán en cultivo celular para que sean lo más seguros posibles, esto es, que sean testeados libres de *Mycoplasma* ya sea por filtro de 0,1  $\mu\text{m}$  o por irradiación gamma.

El test estadístico aplicado al resultado de los cultivos celulares tratados con distintos protocolos de antibióticos no logró evidenciar diferencias significativas (si es que estas existieron) en la eficiencia de curación probablemente por el tamaño muestral no suficiente. De existir diferencias y para poder evidenciarlas, se debiera realizar este mismo procedimiento con un N muestral más grande, de acuerdo a la potencia que se quiera aplicar al test.

Respecto de los resultados obtenidos por PCR, existen variadas explicaciones para las diferencias obtenidas en los triplicados de cada protocolo. En los casos que aparentemente Biomyc 1 – 2 había descontaminado el cultivo y Biomyc 3 volvió a dar positivo en el PCR, una explicación probable es que esas bacterias sean naturalmente resistentes al ciprofloxacino (sustancia activa de Biomyc 3) o, en el caso de haber utilizado sólo Biomyc 3 durante las 3 semanas, las bacterias pueden haber adquirido o desarrollado a través del tiempo esa resistencia al permanecer muchas semanas en cultivo celular.

Otro caso permaneció positivo hasta la tercera semana de tratamiento sólo con Biomyc 3 y fue negativo a las 2 semanas post tratamiento. Debido a que estas muestras se tomaron antes del lavado con PBS, el sobrenadante obtenido fue el que tenía el antibiótico por 3 o 4 días, lo que sugiere que en realidad podrían estarse detectando bacterias muertas que con todos los lavados posteriores finalmente dan como resultado un cultivo descontaminado. Esto se ve reforzado con la desventaja de que el PCR utilizado no permite medir la viabilidad de las bacterias detectadas a través de su DNA genómico. Otra explicación es que la cantidad de bacterias que quedó fue tan mínima que está por debajo del límite de detección de la técnica, ya que esta fue estandarizada con DNA genómico del cultivo celular total, no con una concentración pura de DNA bacteriano.

Puede ser también que muchos de los casos negativos que posteriormente dan positivos a las 2 semanas post tratamiento se hayan contaminado con los cultivos positivos vecinos durante la manipulación por parte del operador. Esto resalta una vez más el riesgo de mantener cultivos contaminados y trabajarlos junto con otros no infectados.

Lamentablemente no existen estudios acabados (sólo algunos pero que no abarcan un espectro amplio) que comparen todas las especies de *Mollicutes* que contaminan con más

frecuencia los cultivos celulares y la efectividad de todos los antibióticos disponibles en el mercado para tratarlos, comparando eficiencia en la curación, resistencias naturales si es que hubiera y porcentaje de recidiva.

Como se pudo apreciar en este trabajo, la línea celular RCNQ7 no se vio seriamente afectada en su proliferación (antes del tratamiento y después de este) respecto de los otros 2 tipos celulares utilizados, esto puede ser porque la/s especie/s de *Mollicutes* que infectaba ese cultivo no tiene entre sus efectos la disminución en la proliferación celular o bien quizás en verdad ese efecto se produjo pero fue contrarrestado por el carácter de línea tumoral de RCNQ7.

A su vez, JF002 y MEF se vieron seriamente afectadas en su proliferación lo que sumado al efecto citotóxico de los antibióticos y de la magnitud del daño celular que provocó la presencia de *Mollicutes* por largo tiempo disminuyó considerablemente la cantidad de células en cultivo.

Como apreciación general, Biomyc 1 y 2 resultaron ser los antibióticos que más células mataron a través del tiempo, aunque parecen ser, sólo apreciando los resultados a simple vista, bastante efectivos en la eliminación de *Mollicutes*. Le seguiría Biomyc 3 que si bien tuvo una eficiencia que parece ser similar, no fue tan citotóxico para los 3 tipos celulares expuestos lo cual es muy valioso al momento de tratar cultivos celulares que no pueden reemplazarse. Resultados similares se han obtenido al comparar BM-Cyclin (Roche) con ciprofloxacino, considerando que las sustancias activas de BM-Cyclin son las mismas que Biomyc y el protocolo de aplicación muy similar (Somasundaram y cols., 1992), destacándose que los efectos citotóxicos de BM-Cyclin se comenzaron a observar a la

semana de tratamiento y que a las 3 semanas, aunque las líneas celulares parecían descontaminadas, pocas células quedaban para seguir trabajando por lo que se probó empíricamente menores concentraciones de los antibióticos, un proceso engorroso y costoso comparado con la simplicidad y poca citotoxicidad de ciprofloxacino.

Finalmente Primocin fue el antibiótico menos citotóxico de todos, siendo la celularidad siempre similar a la del control sin tratamiento, pero lamentablemente no logró descontaminar los cultivos como se esperaba.

Existe otro antibiótico disponible en el mercado llamado MRA (*Mycoplasma Removing Agent*, un derivado de quinolonas) que fue probado en un cultivo de *Plasmodium falciparum* contaminado con *Mycoplasma*. Justamente en ese estudio se comparó Biomyc 1 – 2, Biomyc 3, Plasmocin y MRA. De todos, Biomyc 1 y 2 fueron los más tóxicos para el parásito de la malaria eliminándolo en menos de 24 horas, mientras que Biomyc 3 y Plasmocin lo mataron lenta y progresivamente en 6 días. MRA fue el único que logró eliminar *Mycoplasma* sin matar el parásito que se estaba estudiando en cultivo celular (Singh y cols., 2008).

Este estudio es relevante ya que se aprecia un efecto similar al observado en este trabajo en lo que a “citotoxicidad” refiere, aunque se haya utilizado Plasmocin en vez de Primocin. Si bien Primocin está recomendado para cultivos primarios, Plasmocin está descrito como de uso continuado para prevenir la recurrencia de la infección, por lo que no se consideró dentro de las posibilidades para utilizar en este trabajo. Sería interesante probar MRA en un futuro proyecto con los cultivos celulares utilizados en este trabajo para ver si se obtienen resultados similares al estudio mencionado.

## CONCLUSIÓN

La técnica de PCR efectivamente puede detectar de forma sensible y específica DNA genómico de *Mollicutes* en cultivos celulares. Puede ser complementado con otras técnicas que permitan medir la viabilidad de las bacterias detectadas.

Es factible implementar el uso de luz UV por 15 minutos para irradiar las soluciones que se usan en cultivo celular para erradicar cualquier contaminación que no haya podido ser detectada previamente o sólo como medida adicional de seguridad, no es costoso y tampoco quita tanto tiempo comparado con los desastres que puede ocasionar un cultivo o reactivo contaminado.

No logró detectarse con certeza estadística si hubo diferencias significativas en la eficiencia de curación entre los distintos antibióticos utilizados, pero sí se pudo apreciar cuál tuvo mayor citotoxicidad y se logró formar una apreciación general de su eficiencia individual. De manera general, Primocin fue el que menos descontaminó cultivos, mientras que Biomyc 1, 2 y 3 resultaron bastante eficientes en la descontaminación aunque Biomyc 1 – 2 resultó ser muy citotóxico con los 3 tipos celulares utilizados.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez ML, Juárez CG. Some biological features of *Mollicutes*. Rev Latinoam Microbiol. 2002, 44(2):53-7.
2. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of *mycoplasmas*. Microbiol Mol Biol Rev 1998 (62):1094-1156.
3. Dybvig K, Voelker L. Molecular biology of *Mycoplasmas*. Annu Rev Microbiol 1996, 50:25–57.
4. Pollack, J. D. The necessity of combining genomic and enzymatic data to infer metabolic function and pathways in the smallest bacteria: amino acid, purine and pyrimidine metabolism in *Mollicutes*. Front Biosci 2002, 7:1762-1781.
5. Baseman J, Lange M, Criscimagna N, Giron J, Thomas C. Interplay Between *Mycoplasmas* and Host Target Cells. Microb Pathog 1995, 19(2):105-116.
6. Yavlovich A, Tarshis M, Rottem S. Internalization and Intracellular Survival of *Mycoplasma pneumoniae* by Non-Phagocytic Cells. FEMS Microbiol Lett 2004, 233(2):241-246.
7. Rottem, S. Interaction of *Mycoplasmas* with Host Cells. Physiology Reviews 2003, 83 (2):417-432.
8. Razin S, Jacobs E. *Mycoplasma* adhesion. J. Gen. Microbiol 1992, 138:407-422.
9. Tang J, Hu M, Lee S, Roblin R. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. J Microbiol Methods 2000, 39(2):121-126
10. Uphoff CC, Drexler H. Detection of *Mycoplasma* contaminations. Methods Mol Biol 2005, 290:13-23.

11. Rawadi G, Dussurget O. Advances in PCR-based detection of *mycoplasmas* contaminating cell cultures. *PCR Methods Appl* 1995, 4(4):199-208.
12. Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, MacLeod RA, Quentmeier H, Steube K, Tummler M, Voges M, Wagner B. Sensitivity and specificity of five different *mycoplasma* detection assays. *Leukemia* 1992, 6(4):335-341.
13. Hay, R.J., Macy, M.L., Chen. *Mycoplasma* infection of cultured cells. *Nature* 1989, 339:487–488.
14. Shahhosseiny MH, Hosseiny Z, Khoramkhorshid HR, Azari S, Shokrgozar MA. Rapid and sensitive detection of *Mollicutes* in cell culture by polymerase chain reaction. *J Basic Microbiol* 2010, 50:171–178.
15. Razin S, Hayflick L. Highlights of *mycoplasma* research - An historical perspective. *Biologicals* 2010 38(2):183–190.
16. Stanbridge E. *Mycoplasmas* and Cell Cultures. *Bacteriological Reviews* 1971, 206-227.
17. Hwang JM, Lee JH, Yeh JY. A multi-laboratory profile of *Mycoplasma* contamination in *Lawsonia intracellularis* cultures. *BMC Res Notes* 2012, 5:78.
18. Zhang S, Tsai S, Wu T, Li B, Shih J, Lo S. *Mycoplasma fermentans* infection promotes immortalization of human peripheral blood mononuclear cells in culture. *Blood* 2004, 104(13):4252-4259.
19. Miller CJ, Kassem HS, Pepper S, Hey Y, Ward H, Margiso G. *Mycoplasma* infection significantly alters microarray gene expression profiles. *BioTechniques* 2003, 35:812-814.
20. Zakharova E, Grandhi J, Wewers MD, Gavrilin MA. *Mycoplasma* Suppression of THP-1 Cell TLR Responses Is Corrected with Antibiotics. *PLoS ONE* 2010, 5(3):e9900.

21. Elkind E, Vaisid T, Kornspan JD, Barnoy S, Rottem S, Kosower NS. Neuroprotective effects of *Mycoplasma hyorhinis* against amyloid- $\beta$ -peptide toxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma cells are mediated by calpastatin upregulation in the mycoplasma-infected cells. *Neurochem. Int.* 2011, 58:497–503.
22. Cheng H, Shen C, Wang S. Effect of storage conditions on detection of *mycoplasma* in biopharmaceutical products. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007 (43):113-119.
23. Hecker K, Roux K. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 1996 (20):478-485.
24. Peredeltchouk M, Wilson D, Bhattacharya B, Volokhov D, Chizhikov V. Detection of *Mycoplasma* contamination in cell substrates using reverse transcription-PCR assays. *J Appl Microbiol* 2010, 110(1):54-60.
25. Cenciarini-Borde C, Courtois S, La Scola B. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiol* 2009 (4):45-64.
26. Volokhov D, George J, Liu S, Ikonomi P, Anderson C, Chizhikov V. Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of *Mollicutes* species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, (77):223-232.
27. Mariotti E, Mirabelli P, Di Noto R, Fortunato G, Salvatore F. Rapid detection of *mycoplasma* in continuous cell lines using a selective biochemical test. *Leuk Res* 2008 (32):323-326.
28. Huang L, Dumontelle J, Zolodz M, Deora A, Mozier N, Golding B. Use of toll-like receptor assays to detect and identify microbial contaminants in biological products. *J Clin Microbiol* 2009 (47):3427-3434.

29. Taylor-Robinson D, Bébéar C. Antibiotic susceptibilities of *mycoplasmas* and treatment of mycoplasmal infections. *J Antimicrob Chemother* 1997, 40:622–630.
30. Nims R, Gauvin G, Plavsic M. Gamma irradiation of animal sera for inactivation of viruses and mollicutes: A review. *Biologicals* 2011, 39:370e37.
31. Eterpi M, McDonnell G, Thomas V. Decontamination efficacy against *Mycoplasma*. *Lett Appl Microbiol* 2010, 52:150–155.
32. Held P. Danger of *Mycoplasma* in Cell-Based Assays. *Lab Manager* 2007, 2(5):25-28.
33. Van Kuppeveld F, van der Logt J, Angulo A, van Zoest M, Quint W, Niesters H, Galama J, Melchers W. Genus- and Species-Specific Identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA Amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992, (58):2606-2615. (Author's correction, 59:655, 1993).
34. Young L, Sung J, Stacey G, Masters J. Detection of *Mycoplasma* in cell cultures. *Nature Protocols* 2010, 5:929–934.
35. Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures: A 2 years study. *Biologicals* 2005, 33:81-85.
36. Somasundaram C, Nicklas W, Matzku S. Use of Ciprofloxacin and BM-Cyclin in *Mycoplasma* Decontamination. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992, 28(11/12):708-710.
37. Singh S, Puri SK, Srivastava K. Treatment and control of *mycoplasma* contamination in *Plasmodium falciparum* culture. *Parasitol Res* 2008, 104(1):181-4.