



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCIÓN DE *Mycoplasma* spp. EN CULTIVOS CELULARES  
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

**DETECTION OF *Mycoplasma* spp. IN CELL CULTURES BY  
POLIMERASE CHAIN REACTION**

**Claudia Fernanda Lobos Fuentes**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: CARLOS NAVARRO VENEGAS

SANTIAGO, CHILE  
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETECCIÓN DE *Mycoplasma* spp. EN CULTIVOS CELULARES  
MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

**DETECTION OF *Mycoplasma* spp. IN CELL CULTURES  
BY POLIMERASE CHAIN REACTION**

**Claudia Fernanda Lobos Fuentes**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

NOTA FINAL:.....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: CARLOS NAVARRO VENEGAS	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR	: M. ANGÉLICA MARTÍNEZ	.....	.....
PROFESOR CORRECTOR	: PEDRO SMITH SCHUSTER	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2013

## **RESUMEN**

La contaminación de los cultivos celulares por *Mycoplasma* spp. dificulta tanto la investigación básica como el desarrollo y producción de productos biológicos. Los efectos de esta bacteria en las células cultivadas son cambios en el metabolismo, propiedades inmunológicas y bioquímicas, crecimiento, viabilidad, etc.

La infección de cultivos celulares con *Mycoplasma* spp. puede no ser detectada por inspección visual o microscopía común, por lo tanto, es importante realizar evaluaciones periódicas de rutina con un método rápido, altamente sensible y específico.

En consideración a lo anterior, esta memoria de título se basó en el diagnóstico molecular de *Mycoplasma* spp., mediante la detección del gen 16S rRNA utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional, en muestras procedentes de cultivos celulares de distintos laboratorios de la Universidad de Chile y del Instituto de Salud Pública de Chile.

Los resultados obtenidos tanto en los controles positivos como en los controles negativos, permitieron validar este método en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias y al aplicarlo en muestras sospechosas, se logró la detección positiva en una muestra procedente del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile.

Este hallazgo, fue confirmado por alineamiento de secuencias nucleotídicas respecto de datos oficiales del GenBank®, utilizando los programas *Clustal W* y *BLAST*, ambos de acceso gratuito *on line* que entregaron un 97% de porcentaje de identidad nucleotídica respecto de *Mycoplasma* spp.

Palabras clave: Cultivos celulares, *Mycoplasma* spp., Gen 16S rRNA, PCR.

## **ABSTRACT**

Contamination of cell cultures with *Mycoplasma* spp. complicates the basic investigation and the development and production of biological products. The effects of these bacteria on cultivated cells are changes in the metabolism, immunological and biochemical properties, growth, viability, etc.

The *Mycoplasma* spp. infection on cell cultures might not be detected by visual inspection or common microscopy. Hence, it is important to go through routine periodic evaluations with a highly sensible and highly specific fast method.

Regarding the previous statement, this memoir was based on the molecular diagnosis of *Mycoplasma* spp., by detecting the 16S rRNA gene through the conventional polymerase chain reaction technic, on cell culture samples from different laboratories of the University of Chile and the Institute of Public Health of Chile.

The results obtained in positive controls as in negative controls, allowed the validation of this method in the Faculty of Veterinary Sciences and by applying it on suspicious samples from the Institute of Biomedical Sciences of the University of Chile, one positive result was obtained.

This finding was verified by alignment of nucleotidic sequences, with reference to official data from the GeneBank®, using the Clustal W and BLAST software, both online freeware, giving a 97% of the percentage of nucleotidic identity respect to *Mycoplasma* spp.

Keywords: Cell cultures, *Mycoplasma* spp., 16S rRNA gene, PCR.

## INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas están ampliamente distribuidos en la naturaleza como parásitos de mamíferos, aves, reptiles, peces, artrópodos y plantas (5). La mayoría pertenece a la microbiota normal de sus hospederos, sin embargo, algunos son patógenos primarios y muchos de carácter oportunista (16).

En medicina veterinaria constituyen un problema al generar cuadros de neumonía, pleuroneumonía, pleuritis, aerosaculitis, conjuntivitis, vulvovaginitis, mastitis, condrodistrofia, otitis y eritrodermatitis tanto en especies domésticas como animales de laboratorio (5).

Varias especies de micoplasmas han sido descritas como contaminantes habituales de cultivos celulares, lo que representa un grave problema, ya que causan diversas alteraciones en el metabolismo celular y privan a la célula hospedera de nutrientes esenciales (15).

La detección de estos microorganismos en los cultivos celulares constituye actualmente un requerimiento indispensable para alcanzar los estándares de calidad de los laboratorios (15). Se han usado múltiples métodos para su detección, es así como Uphoff y Drexler en 2011 plantean la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como el método más recomendado por su sensibilidad y especificidad.

El uso del PCR no sólo permite la detección temprana de la contaminación por micoplasmas en cultivos celulares, sino que también entrega datos útiles para determinar características epidemiológicas y filogenéticas (1).

En este contexto, la implementación de esta técnica como procedimiento de rutina para la evaluación de la calidad de cultivos celulares resultaría útil además para el diagnóstico de estos microorganismos en muestras de origen veterinario.

Los micoplasmas pertenecen a la clase *Mollicutes* (del latín: *mollis*, suave; *cutis*, piel), orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae*, género *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, con numerosas especies integrantes (13). Corresponden a uno de los organismos vivos más pequeños existentes, tanto en tamaño (300 a 800 nanómetros (nm)) como en genoma (580 kilobases (kb)). Carecen de pared celular, son sensibles a agentes lipolíticos, se desarrollan en medios artificiales complejos, poseen un metabolismo principalmente fermentativo y la mayoría son anaerobios facultativos (5).

Cabe destacar su marcado tropismo por las membranas citoplasmáticas de las células eucarióticas, de las cuales obtienen colesterol que incorporan en su propia membrana celular para darle mayor estabilidad. Esta propiedad los hace ubicuos, habiendo sido aislados en cerca de 120 especies animales y vegetales (15)

Los micoplasmas usualmente infectan hospederos específicos pero, en el caso de animales, algunas especies pueden encontrarse en diferentes hospederos. La barrera humana de hospederos raramente es cruzada por micoplasmas de origen animal. Sin embargo, en cultivos celulares pueden encontrarse especies tanto de origen humano como animal (16).

Actualmente, la contaminación de cultivos celulares con bacterias, hongos y levaduras representa un problema mayor en los laboratorios. En general, estos organismos son fácilmente detectados mediante la turbidez del cultivo y observación bajo microscopio invertido, pero los micoplasmas corresponden a una clase de bacteria que regularmente evade la detección (17).

Los micoplasmas, a diferencia de otras bacterias, crecen lentamente y no producen cambios apreciables en los cultivos. Sin embargo, producen alteraciones en el metabolismo celular, lo que va en detrimento de los procesos de investigación, diagnóstico y producción. En otras palabras, la contaminación de cultivos celulares por *Mollicutes* es un hecho frecuente en los laboratorios, reportándose hasta un 80% de cultivos contaminados, lo que resulta en ensayos experimentales poco confiables y en productos biológicos poco seguros (15).

En la mayoría de los casos la infección se origina desde suero animal contaminado y su diseminación en el laboratorio es a través de aerosoles. La frecuencia de infección en cultivos celulares es de aproximadamente un 30% (16) y su variación depende del origen y tipo de cultivo celular, duración del período de evaluación y la eficiencia de los procedimientos aplicados (17).

Las especies contaminantes dominantes de *Mycoplasma* se han mantenido a lo largo de los años. *M. hyorhinis*, *M. orale*, *M. arginini*, *M. fermentans* y *Acholeplasma laidlawii* constituyen el 95% de las especies identificadas. De éstas, *M. orale* y *M. fermentans* forman parte de la microbiota comensal orofaríngea y genital humana, mientras que las otras especies tienen un origen animal (5, 15).

Estos microorganismos usualmente se adhieren a las células, pero dependiendo de la especie, pueden fusionarse con la célula hospedera e incluso invadirla, generando múltiples

consecuencias. En primer lugar, se describe una modulación de la respuesta inmune, que se explica por la capacidad de los micoplasmas tanto de estimular como suprimir a linfocitos T y B. La estimulación es mediada por la inducción de las citoquinas proinflamatorias IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\alpha$ , INF- $\beta$  e INF- $\gamma$  que aumentan la toxicidad de macrófagos, células NK, linfocitos T y B junto a la activación de la cascada del complemento. Por otro lado, la supresión está dada por la inducción de las citoquinas IL-10 e IL-13 que suprimen la proliferación de linfocitos T y la excesiva producción de citoquinas proinflamatorias por parte de macrófagos. La modificación de la morfología celular es producto de la unión de adhesinas del micoplasma a componentes de la matriz extracelular de la célula hospedera y también por la generación de señales que producen cambios específicos en el citoesqueleto. La interferencia con la replicación viral se debe a los INF- $\alpha$  e INF- $\beta$  inducidos por muchas especies de micoplasmas, los cuales promueven la actividad citotóxica de linfocitos T y células NK contra células infectadas por virus. Las modificaciones cromosómicas son producto de la liberación de enzimas hidrolíticas como endonucleasas, las cuales sugieren daño cromosomal. Por último, la interrupción del metabolismo celular considera la suma de todos los efectos anteriores junto a la liberación de componentes citotóxicos como peróxido de hidrógeno en la célula hospedera provocando un daño oxidativo y la alteración de la funcionalidad de genes producto de la generación de cascadas de señales desde la membrana citoplasmática al núcleo (13,16).

Entre los métodos de detección de micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares se han empleado la tinción fluorescente del DNA, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (Tinción de Hoechst o DAPI) y las técnicas inmunológicas, como la inmunofluorescencia directa (IFD). Estas técnicas son rápidas y simples de efectuar, pero en el caso de la tinción DAPI su sensibilidad y especificidad es limitada y en la IFD requieren un panel de anticuerpos monoclonales difíciles de obtener (15). Desde luego, el aislamiento es siempre la “prueba de oro” para confirmar positividad. Sin embargo, es técnicamente muy compleja y lenta, ya que este microorganismo posee características muy particulares, siendo exigente desde el punto de vista nutricional y sensible a variaciones de pH, temperatura y presión osmótica. Por lo tanto, se deben garantizar condiciones óptimas para su desarrollo en medios de cultivo para mantener o aislar cepas (9).

En los últimos años, el PCR ha sido empleado como una alternativa altamente sensible para la detección de estos microorganismos en cultivos celulares y sus insumos (15). Esta técnica ha demostrado ser un método muy específico y sensible que permite la amplificación de bajas cantidades de ácidos nucleicos hasta un nivel que puede ser fácilmente detectado (1).

Dada la gran cantidad de especies que es posible detectar como contaminantes, los partidores más utilizados están diseñados para reconocer el gen 16S rRNA (14), teniendo en cuenta su carácter constitutivo y altamente conservado (6).

El 16S rRNA corresponde a un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o DNA ribosómico (16S rDNA) e incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Su secuencia presenta en forma aproximada 1.500 pares de bases (pb) y se compone por zonas variables especie-específicas y zonas conservadas (8). Los mismos autores señalan que los partidores universales elegidos son complementarios a las zonas conservadas del inicio y final del gen. Por otro lado, las zonas variables comprendidas entre estas zonas conservadas son las regiones utilizadas para realizar una taxonomía comparativa. Actualmente, GenBank® es la base de datos con mayor información ya que contiene más de dos millones de secuencias depositadas de este gen, sin embargo, aquellas relevantes están disponibles para sólo un número limitado de *Mollicutes*.

Hace algunos años atrás, se desarrolló un protocolo de PCR específico para el género *Mycoplasma* utilizando el partidador inverso específico MGSO (18) en combinación con un nuevo partidador denominado GPF, con el fin de amplificar un producto de PCR de mayor tamaño, resultando un fragmento de 1013 pb. El diseño de GPF se realizó en base a la comparación y alineamiento al gen 16S rRNA de numerosas especies conocidas de *Mycoplasma* con el uso del programa *Clustal W* (11).

La especificidad de este PCR fue confirmada por Lierz y colaboradores (11) utilizando como referencia 35 especies distintas de *Mycoplasma* y otras 9 bacterias con pared celular. Como resultado, se amplificó un fragmento de DNA del tamaño esperado en el 100% de los aislados de *Mycoplasma* testeados y en ninguna de las otras bacterias. Finalmente, su sensibilidad fue evaluada por medio de 10 diluciones seriadas de DNA de *M. synoviae* y *M. gypis*, así como también cultivos de estas mismas especies, entregando un valor de 1 pg de DNA (1 UFC).



En términos generales, los mismos autores describen al PCR género-específico para *Mycoplasma* como una buena herramienta diagnóstica debido a que no presentó riesgo de contaminación, la modificación de la técnica inicial no redujo su sensibilidad y el tamaño del producto amplificado permitió la diferenciación por especie de esta bacteria a través de su secuenciación.

De acuerdo a estos antecedentes, en esta memoria de título se desarrolló un protocolo de PCR dirigido a la detección del gen 16S rRNA ya que se considera un procedimiento útil para el diagnóstico de estos microorganismos en cultivos celulares. Sin embargo, si bien la detección de un fragmento de 1013 pb es necesaria, no es suficiente para garantizar la presencia de *Mycoplasma* spp. en una muestra. Por ello, la etapa siguiente contempló la secuenciación del amplificado y la incorporación de esta secuencia en un software *on line* de libre disposición denominado *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* para la obtención de un Porcentaje de Identidad Nucleotídica (PIN) respecto a la base de datos oficial Genbank®. De esta forma, si dos genes se consideran diferentes uno del otro frente a un valor de identidad de secuencia menor o igual a 79% (8), un valor de PIN en las muestras de este estudio mayor a 80% garantizaba la presencia de *Mycoplasma* spp.

En síntesis, se detectó mediante el PCR género-específico un fragmento constitutivo del gen 16S rRNA de *Mycoplasma* spp., validado por la secuenciación nucleotídica realizada. De esta forma, se estableció un procedimiento de rutina rápido y eficaz para detectar la contaminación precoz de esta bacteria, evitando así futuros problemas relacionados con el quehacer científico tanto en los laboratorios de los Departamentos de Medicina Preventiva Animal y de Patología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, como en otras dependencias que lo requieran.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestras y Controles**

Este estudio se realizó en los laboratorios de Microbiología y de Virología del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FAVET), Universidad de Chile.

Para la implementación del PCR se utilizó como control positivo DNA de *M. pneumoniae* cepa FH procedente de la Unidad Académica de Parasitología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Universidad de Chile y como controles negativos se utilizaron medios de cultivo libres de suero fetal bovino y DNA de origen viral y bacteriano (Virus Herpes Canino tipo 1, *Staphylococcus intermedius* y *Enterococcus faecium*) mantenidos a -20°C en los laboratorios de Microbiología y Virología de FAVET, Universidad de Chile. Adicionalmente, como control de reactivos se utilizó agua libre de nucleasas.

Una vez establecido el protocolo de PCR se incorporó a este estudio 20 muestras procedentes de cultivos celulares positivos (Laboratorio de Virología (ICBM), Unidad Académica de Parasitología (ICBM), Unidad de Virología del Instituto de Salud Pública (ISP) y 20 muestras procedentes de muestras sospechosas (Laboratorios de Patología de Peces y de Virología, ambos de FAVET) de infección por *Mycoplasma* spp. y en estos casos, para la extracción del DNA bacteriano a partir de los cultivos celulares se procesó una alícuota de 500 µL del sobrenadante de cada uno, mediante el *kit* comercial Wizard SV Genomic DNA® (Madison, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cantidad de DNA obtenido se cuantificó mediante medición de absorbancia a 260 nm (13) en un espectrofotómetro (UNICAM UV/vis ®) del Laboratorio de Bioquímica de FAVET. Para verificar posibles diferencias en la detección mediante PCR, cada muestra sospechosa fue estudiada con y sin extracción del DNA correspondiente. Como controles negativos se contempló el uso de 20 muestras procedentes de medios de cultivos celulares libres de suero fetal bovino y de uso rutinario en los laboratorios mencionados.

### **Detección del gen 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. mediante PCR género-específico**

- a) Partidores: En la reacción de PCR se utilizaron los partidores GPF 5'-GCTGGCTGT GTGCCT-3' y MGSO 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGGTACCCTC-3' que generan un

fragmento de 1013 pb (9). Ambos partidores fueron sintetizados por el Centro de Equipamiento y Servicios de Apoyo Tecnológico (Cesat) del ICBM, Universidad de Chile.

- b) Mezcla de la reacción (en triplicado): Para lograr la mezcla de amplificación del DNA purificado, se utilizó un kit 2X PCR Master Mix Fermentas®, que incluye la polimerasa termoestable, los desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), el buffer de reacción y MgCl<sub>2</sub>, del que se extrajeron 15 µL que se vertieron en un tubo Eppendorf de 0,2 mL, junto a 5 µL de cada uno de los partidores, y 5 µL de la muestra de DNA molde, obteniendo un volumen total de 30 µL.
- c) Amplificación del DNA: El protocolo estuvo definido por una incubación inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 30 segundos y síntesis a 72°C por 30 segundos. Una vez completados los ciclos, se realizó una elongación final a 72°C por 10 minutos (11).
- d) Visualización del producto amplificado: Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2% en buffer Tris Acetato EDTA (TAE) (Fermentas®), el cual se sometió luego de la electroforesis a inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/mL) (Fermelo®). El producto de PCR se mezcló con 6 µL del producto comercial de carga, 6X “Mass Ruler Loading Dye Solution” (Fermentas®), que posee glicerol para dar densidad a la muestra y azul de bromofenol para chequear el progreso de la migración de las bandas de DNA. Una alícuota de 5 µL de esta mezcla se depositó en el pocillo respectivo del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 90 V por 90 minutos. Se utilizó 5 µL de *Hyperladder*<sup>TM</sup> IV (Bioline®) como marcador de tamaño molecular (MTM), que contiene fragmentos de DNA entre 100 y 1.000 pb para facilitar la detección de los fragmentos amplificados. Finalizado el procedimiento, el gel fue incubado en bromuro de etidio (0,5 µl/ml) por 30 minutos y una vez teñido se visualizó en el transiluminador ultravioleta (Transiluminator UVP®), para finalmente ser fotografiado con una cámara digital.

#### **Determinación del PIN respecto del GenBank®**

- a) Secuenciación: Los fragmentos de DNA obtenidos mediante el PCR se enviaron a la empresa Genytec para la determinación de su secuencia nucleotídica.
- b) Análisis: Las secuencias obtenidas se alinearon usando el programa *Clustal W 2.2.012* inicialmente para obtener una secuencia consenso y posteriormente se utilizó el programa

*BLAST* para establecer el PIN respecto a secuencias oficiales del gen 16S rRNA disponibles en el GenBank®.

### **Análisis de resultados**

Toda muestra que en la visualización bajo luz UV originó un fragmento de DNA cercano a 1.000 pb se consideró sospechosa de provenir de *Mycoplasma* spp., y también positiva si el PIN respectivo fuese mayor o igual a 80% ( $\text{PIN} \geq 80\%$ ).

### **Medidas de bioseguridad**

Las medidas de bioseguridad asociadas a este estudio consistieron en el acceso limitado a las instalaciones, uso de un gabinete de bioseguridad al momento de la extracción del DNA bacteriano, uso de mechero Bunsen para delimitar una zona de trabajo biolimpia y uso de delantal.

Cabe destacar que tanto los controles positivos como negativos correspondían a DNA extraído previamente y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En el caso de las muestras de cultivos celulares, los tubos Eppendorf que las contenían fueron sometidos a  $80^{\circ}\text{C}$  por diez minutos antes de procesarlas.

Para la realización del PCR, se requirió delimitar una zona limpia y exclusiva para evitar la contaminación con material genético no proveniente de la muestra y la utilización guantes de látex para realizar los procedimientos.

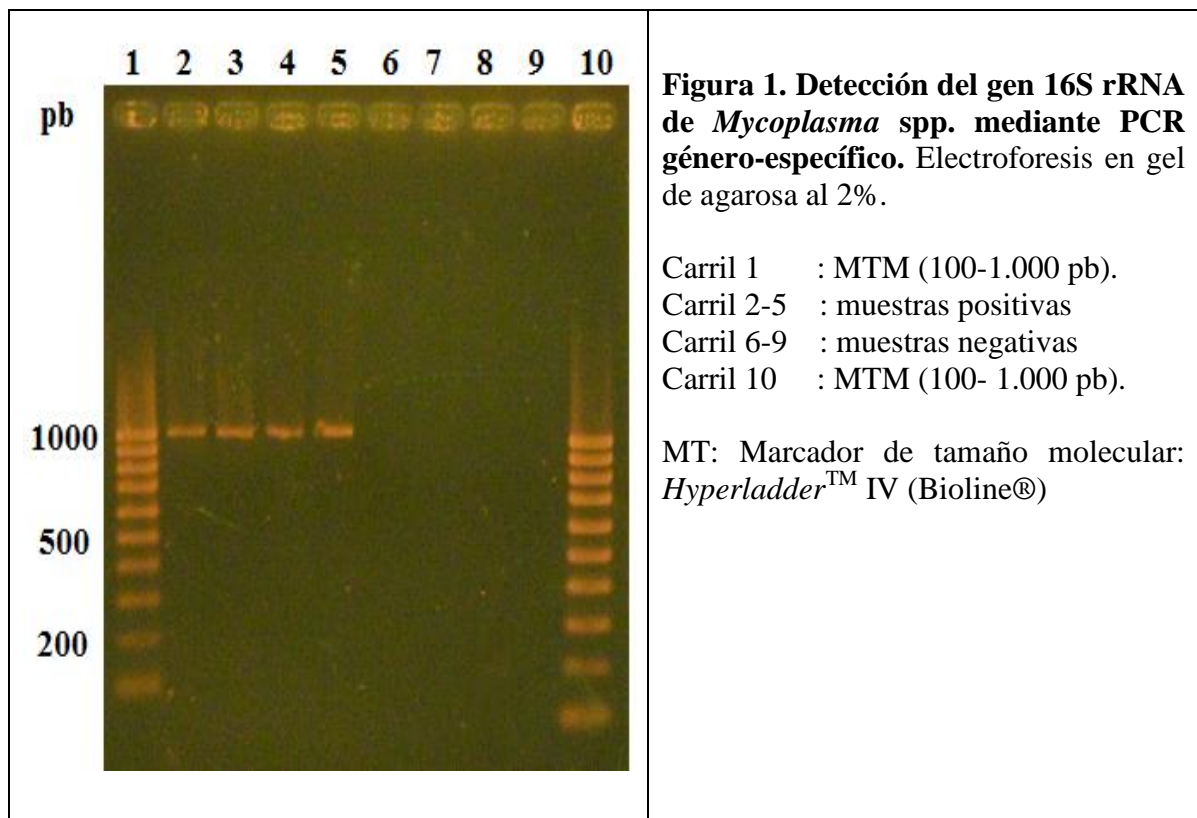
Para la visualización del producto del PCR fue necesario el uso de guantes, debido a que se utilizó bromuro de etidio, el cual tiene propiedades mutagénicas. Al momento de utilizar el transiluminador de luz ultravioleta se requirió contar con gafas con filtro UV y una placa de acrílico situada entre el equipo y el operador.

Finalmente, el gel fue incinerado en FAVET junto con los guantes que se utilizaron para su manipulación.

## RESULTADOS

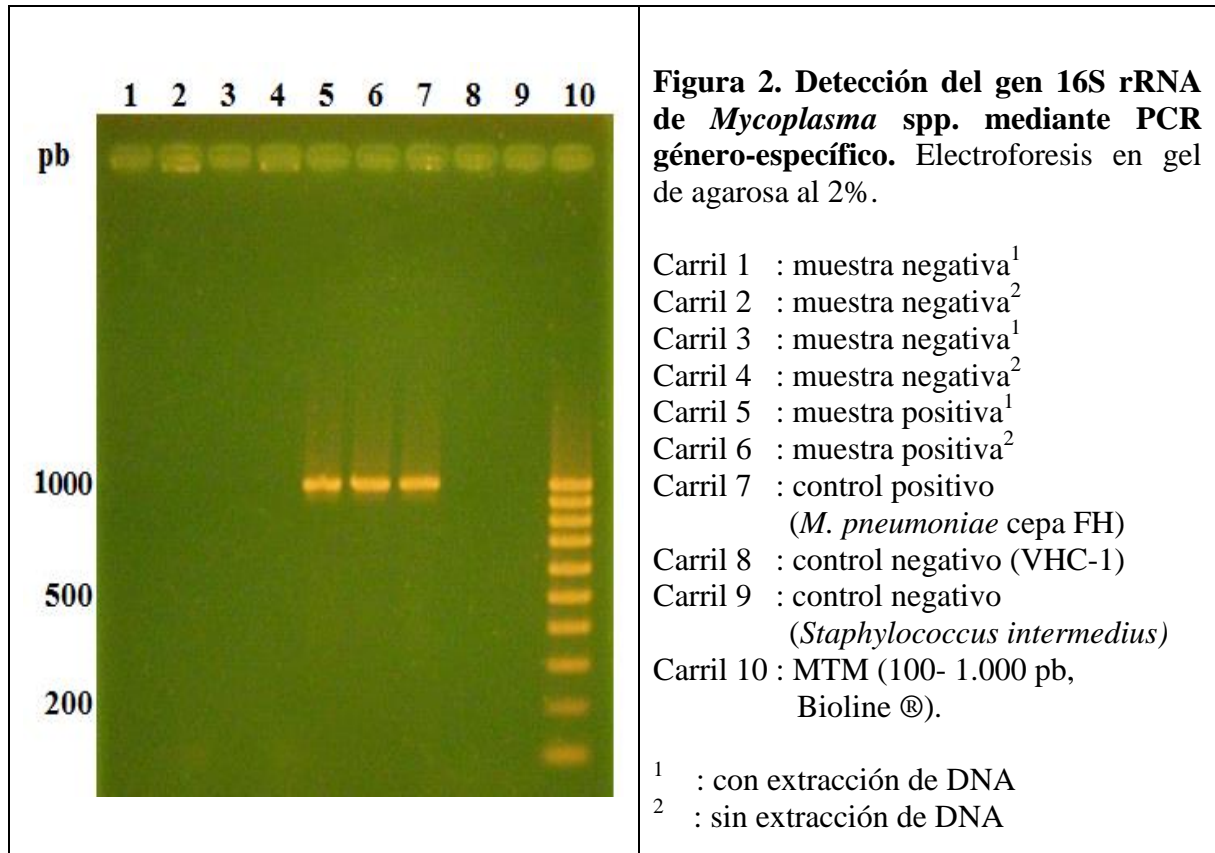
### PCR género-específico de *Mycoplasma* spp.

Al realizar el PCR tanto en 20 muestras de DNA procedentes de cultivos celulares positivos como en otras 20 de distinto origen (viral y bacteriano) y de medios de cultivos celulares libres de suero fetal bovino, fue posible verificar su estado. A modo de ejemplo, la Figura 1 grafica el resultado obtenido por cuatro muestras positivas y cuatro muestras negativas. Así, luego de la incubación del gel en bromuro de etidio, en los pocillos que incluían muestras positivas se visualizó un fragmento de DNA, de un tamaño cercano a 1.000 pares de bases, representado por una banda única, nítida y ancha.



Al aplicar esta metodología a las 20 muestras de DNA sospechosas de infección por *Mycoplasma* spp., sólo una de ellas resultó positiva y a modo de ejemplo se grafica en la Figura 2 junto al control positivo. Esta muestra, procedente de un sobrenadante de cultivo de células MDCK resultó positiva con y sin extracción de DNA, observándose en ambos

casos un fragmento de DNA de tamaño molecular alrededor de 1.000 pares de bases e igual calidad de visualización.



### Análisis del fragmento de DNA secuenciado

Los amplificadores procedentes de la muestra positiva fueron enviados en quintuplicado a secuenciar a Genytec Ltda. y se recibieron cinco secuencias de alrededor de 500 pb.

```
>CL1
ACCTTATTAGAAAGCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTT
ATCCGCAATTATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTTCGCTAAGTCTGGAGTTAAATGCTGAAGC
TCAACTTCAGTCCGCTTCGGATATTGGCAAAATAGAATTATAAAGAGGTTAGCGCAATTCCTAGTG
AAGCGGTGGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCAATAGGCGAAGGCAGCTAATTGGTTATATAT
TGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGATCATTAGTTGGTGAATAATTCCACTAACGCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCCTGAGT
AGTATGCTCGCAAGAGTGAACTTAAAGCAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGAAGATACGCGTAGAACCTTACCCAA
```

>CL2

TACGGTACCCCTCCTGAAAGCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAGGGCGGGGGTCGCA  
AGCGCCTTCCGGAACCAAAGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGAAATTCGCTAAGTCTGGAGCCTAATGC  
TGAAGCTCAACTTCAGTCCGCTTCGGGGGTGGCAAAGGGGAACCTTAAAGAGGCCTGCGCAATTC  
CTAGTGAAGCGGTGGAATGCGTAGGGGCCTGGAAGAACACCAGGGGGCGAAGGCAGCTAATTGGCC  
TTGGGTTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGACCTGGGGCCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGATGATCACCTGTTGGTGGAGGGATTCCACTAACGCAGCTAACGCGCCTAATGATCCGC  
CTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACCCCTAAGCAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGC  
ATGTGGTCCTATTCGAAGGGGCGCGTAG

>CL3

CGTACCTTATTAGAAAGCGTTAGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTTTAAACATAGGTTCGCAAGC  
GTTATCCGGTTATATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTCGCTAAGTCTGGAGTTATTAGCTGA  
AGCTCAACTTCAGTCCGCTTCGGATATTGGCAATTAAGTTATATAAAGAGGTTAGCGGTTATCCTA  
GTGAAGCGGTGGTTAGCGTAGATATTAGGAAGAACACCTAAGGCGAAGGCAGCTTTATGGTTATA  
TATTGACACTAAGGGTTAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCTACCCT  
TTATTTAGATCATTAGTTGGTGGTTATTATCCACTATTACAGCTATTACGTTATTAGATCCGCCTG  
AGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGGTTATGTTAGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATG  
TGTTTTTTATCGAAGATTTACGTAGAACCTA

>CL4

CCTTTATTAGAAAGCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGATACGGTTACGCATAGGTTCGCAAGCGTT  
ATCCGCAATTATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTCGCTAAGTCTGGAGTTAAATGCTGAAGC  
TCAACTTCAGTCCGCTTCGGATATTGGCAATACGGAATGATAAAGAGGTTAGCGCAATTCCCTAGTG  
AAGCGGTGGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCTACGGGCGAAGGCAGCTAATTGGTGATATAT  
TGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGATATAAA  
CGATGATCATTAGTTGGTGGTACGATTCCACTAACGCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCCTGAGT  
AGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGCAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG  
TTTAATTTCGAAGATACGCGTAGAACCTTACCCA

>CL5

AGGTACCTTATTAGAAAGCGACGGCAAACCTAGATTATAGCAGATTTCGGTAATACATAGGTTCGCAAG  
CGTTATCCGCAATTATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGGATTACGCTAAGTCTGGAGTTAAATGCTG  
AAGCTCAACTTCAGTCCGCTTCGGATATTGGCAAAATAGAATTATAAAGAGGTTAGCGCAATTCCCT  
AGTGAAGCGGTGGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCAATAGGCGAAGGCAGCTAATTGGTTAT  
ATATTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGATT  
TAAACGATGATCATTAGTTGGTGGGATTATCCACTAACGCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCCT  
GAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGCAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCAG  
ATTGTTTTAATTCGAAGATACGCGTATC

Estas secuencias fueron alineadas mediante el programa *Clustal W 2.2.012* para obtener una secuencia consenso.

CLUSTAL W 2.2.012 Multiple sequence alignment

CL1 ----ACCTTATTAGAAAAGCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAG 54  
CL5 AGGTACCTTATTAGAAAAGCGACGGCAAACCTAGATTATAGCAGATTCGGTAATACATAG 58  
CL4 ----CCCTTATTAGAAAAGCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGATACGGTTACGCATAG 54  
CL3 -CGTACCTTATTAGAAAAGCGTTAGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTTAACATAG 57  
CL2 CGGTACCCCTCCTGAAAAGCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAGGGCGGGG 60  
          \*\*          \*\*\*\*\*          \*\*\*\*\*          \*          \*\*\*\*\*          \*\*\*\*          \*          \*

CL1 GTCGCAAGCGTTATCCGCAATTATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTCGCTAAGTCT 114  
CL5 GTCGCAAGCGTTATCCGCAATTATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGGATTACGCTAAGTCT 118  
CL4 GTCGCAAGCGTTATCCGCAATTATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTCGCTAAGTCT 114  
CL3 GTCGCAAGCGTTATCCGTTATATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTCGCTAAGTCT 117  
CL2 GTCGCAAGCGCCTTCCGGAACCAAAGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGAAATTCGCTAAGTCT 120  
\*\*\*\*\*          \*\*\*\*          \*          \*\*\*\*\*

CL1 GGAGTTAAATGCTGAAGCTCAACTTCAGTCCGCTTCGGATATTGGCAAATAGAAATTATA 174  
CL5 GGAGTTAAATGCTGAAGCTCAACTTCAGTCCGCTTCGGATATTGGCAAATAGAAATTATA 178  
CL4 GGAGTTAAATGCTGAAGCTCAACTTCAGTCCGCTTCGGATATTGGCAATACGGAATGATA 174  
CL3 GGAGTTAATAGCTGAAGCTCAACTTCAGTCCGCTTCGGATATTGGCAATTAAGTTATATA 177  
CL2 GGAGCCTAATGCTGAAGCTCAACTTCAGTCCGCTTCGGGGTTGGCAAAGGGGAACCTTA 180  
\*\*\*          \*\*\*\*\*

CL1 AAGAGGTTAGCGCAATTCCCTAGTGAAGCGGTGGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCA 234  
CL5 AAGAGGTTAGCGCAATTCCCTAGTGAAGCGGTGGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCA 238  
CL4 AAGAGGTTAGCGCAATTCCCTAGTGAAGCGGTGGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCT 234  
CL3 AAGAGGTTAGCGGTTATCCCTAGTGAAGCGGTGGTTAGCGTAGATATTAGGAAGAACACCT 237  
CL2 AAGAGGCTGCGCAATTCCCTAGTGAAGCGGTGGAATGCGTAGGGGCTGGAAGAACACCA 240  
\*\*\*\*\*          \*\*          \*\*\*\*\*          \*\*\*\*\*          \*\*\*\*\*

CL1 ATAGGCGAAGGCAGCTAATTGGTTATATATTTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCA 294  
CL5 ATAGGCGAAGGCAGCTAATTGGTTATATATTTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCA 298  
CL4 ACGGGCGAAGGCAGCTAATTGGTGATATATTTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCA 294  
CL3 TAAGGCGAAGGCAGCTTTATGGTTATATATTTGACACTAAGGGTTAAAAGCGTGGGGAGCA 297  
CL2 GGGGCGAAGGCAGCTAATTGGCCTTGGGTTGACACTAAGGGACGAAAGCGTGGGGAGCA 300  
\*\*\*\*\*          \*\*          \*          \*\*\*\*\*          \*\*\*\*\*

CL1 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCATTAGTTGGTGGA-AT 353  
CL5 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGATTTAAACGATGATCATTAGTTGGTGGG-AT 357  
CL4 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGATATAAACGATGATCATTAGTTGGTGGT-AC 353  
CL3 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCCTACCCTTTATTTAGATCATTAGTTGGTGTTAT 357  
CL2 AACAGGACCTGGGGCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCACCTGTTGGTGGA-GG 359  
\*\*\*\*\*          \*          \*\*\*\*\*          \*          \*          \*\*\*\*\*          \*\*\*\*\*



```

CL1  AATTCCTAACGCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGT 413
CL5  TATTCCTAACGCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGT 417
CL4  GATTCCTAACGCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGT 413
CL3  TAT-CCACTATTACAGCTATTACGTTATTAGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGT 416
CL2  GATTCCTAACGCAGCTAACGCGCTAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGT 419
      ** ***** ***** ** *****

CL1  GAAACTTAAAGCAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA 473
CL5  GAAACTTAAAGCAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCAGATGTGTTTAAATTCGAA 477
CL4  GAAACTTAAAGCAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA 473
CL3  GAAACTTAAAGGTTATGTTAGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTTATTCGAA 476
CL2  GAAACCTAAGCAATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTCTTATTCGAA 479
      ***** *** ** ***** * ** *****

CL1  GATACGCGTAGAACCTTACCCAA 496
CL5  GATACGCGTA---TC----- 489
CL4  GATACGCGTAGAACCTTACCCAA- 495
CL3  GATTTACGTAGAACCTA----- 493
CL2  GGGGCGCGTAG----- 490
      * ****

```

## Secuencia consenso

```

>CFLEF
ACCTTATTAGAAAAGCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCG
CAATTATCGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTTTTTCGCTAAGTCTGGAGTTAAATGCTGAAGCTCAACTTCAG
TCCGCTTCGGATATTGGCAAAATAGAATTATAAAGAGGTTAGCGCAATTCCTAGTGAAGCGGTGGAATGCG
TAGATATTAGGAAGAACACCTATAGGCGAAGGCAGCTAATTGGTTATATATTGACACTAAGGGACGAAAGC
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCATTAGTTGGTGGTTATT
ATTTCCTAACGCAGCTAACGCGTTAAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGG
AATTGACGGGAACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGATACGCGTAG

```

Luego, esta secuencia fue analizada según el programa *BLAST*, que determinó un PIN de 97% respecto del gen 16S rRNA de *Mycoplasma* spp.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis GDL-1, complete genome</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">CP003231.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 14858</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">AB680688.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyopneumoniae strain USP14P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227407.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP74T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227381.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP72T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227376.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis ATCC 17981 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227372.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain GDL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribo</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">EU859976.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain BTS7 16S ribosomal RNA, partial sequence &gt;qbJAF412982.1JA</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">NR_041845.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain BTS7 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial sequence</a>	822	822	100%	0.0	97%	<a href="#">AF258792.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP72N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	819	819	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227386.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP120N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	819	819	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227377.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis SK76, complete genome</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">CP003914.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis HUB-1, complete genome</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">CP002170.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP67P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227383.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP83T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227380.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP36P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227378.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP10T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227374.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP3T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227373.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial sequence</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">AF258794.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial sequence</a>	817	817	100%	0.0	97%	<a href="#">AF258793.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP60P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	813	813	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227384.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP6T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	813	813	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227375.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP80P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	811	811	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227387.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP8T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	811	811	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227385.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP35P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	811	811	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227379.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP2T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	808	808	100%	0.0	97%	<a href="#">GU227382.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis ATCC:29052 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S rri</a>	806	806	100%	0.0	97%	<a href="#">EU714234.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis MCLD, complete genome</a>	800	800	100%	0.0	96%	<a href="#">CP002689.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP83P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	800	800	100%	0.0	96%	<a href="#">GU227400.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis isolate LuSIV 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ri</a>	800	800	100%	0.0	96%	<a href="#">EU643797.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyorhinis strain USP17N 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	750	750	96%	0.0	96%	<a href="#">GU227402.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma conjunctivae strain HRC/581T (NCTC10147) 16S ribosomal RNA, complete se</a>	745	745	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_074135.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma conjunctivae HRC/581T complete genome</a>	745	745	100%	0.0	94%	<a href="#">FM864216.2</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma conjunctivae strain Goat 655 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-</a>	745	745	100%	0.0	94%	<a href="#">FJ226571.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma conjunctivae strain HRC/583 16S ribosomal RNA, partial sequence &gt;qbJU4477</a>	745	745	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_044781.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyopneumoniae 232 strain 232 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	739	739	100%	0.0	94%	<a href="#">NR_075023.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Mycoplasma hyopneumoniae strain ATCC 27714 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc</a>	739	739	100%	0.0	94%	<a href="#">JN935889.1</a>

## DISCUSIÓN

Los productos de amplificación se caracterizaron por su gran intensidad y nitidez, no observándose bandas de amplificación inespecífica o degradación de DNA en ningún caso. Cabe mencionar que el 100% de las muestras controles positivas generaron una banda única cercana a 1.000 pb, consistente con el tamaño del gen 16S rRNA.

Por otro lado, el alto PIN obtenido demuestra que efectivamente el fragmento de DNA amplificado en la única muestra sospechosa positiva correspondería al gen 16S rRNA de *Mycoplasma* spp. Dicha muestra positiva a la contaminación de *Mycoplasma* spp., con y sin extracción de DNA, corresponde a un cultivo celular de células MDCK que presentó problemas en su crecimiento en el Laboratorio de Virología de FAVET. Esta situación se le informó al proveedor (ICBM), el cual ratificó su estado.

Las bandas generadas en la electroforesis por dicha muestra, tanto del cultivo directo como del DNA purificado, mostraron similar grado de fluorescencia y sugiere que en ambos casos fue posible detectar una cantidad de DNA similar en los amplicones. Lo anterior, de acuerdo a la comparación de su fluorescencia respecto del MTM, el cual no sólo proporciona información del tamaño de banda sino que también entrega una aproximación acerca de la cantidad de DNA (4).

El alto PIN obtenido indica la presencia de *Mycoplasma* spp., sin embargo, el programa *BLAST* indicaría que se trata de *M. hyorhinis* o *M. hyopneumoniae*. Para la identificación de la especie de *Mycoplasma* en particular, se necesitaría secuenciar un mayor número de bases, es decir secuenciar más de 500 bases, que es el máximo que secuencía el equipo de Genytec. No obstante, lo recién señalado no tiene incidencia para los efectos de esta Memoria de Título, ya que los objetivos han sido alcanzados con creces.

Cabe destacar, en relación a la información otorgada por el software *BLAST*, que *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae* corresponden a una de las especies contaminantes más comúnmente identificadas (5,15). En base a esto, se infiere que la contaminación del único cultivo celular afectado sería producto de la utilización de suero animal infectado con la

bacteria (7). Por ello, es necesario el uso de medidas de control específicas, tal como el PCR género-específico utilizado en este estudio.

En esta memoria de título se evidenció que la detección de *Mycoplasma* spp. mediante el PCR género-específico no requeriría de la purificación del DNA bacteriano a partir del sobrenadante del cultivo celular, sino que puede realizarse en forma directa con la condición previa de someter la muestra a 80° C por diez minutos para evitar el riesgo de infección. Esto, además de influir en el tiempo y costos implicados, evita la posibilidad de obtener falsos negativos por acción de inhibidores del PCR. Una amplia gama de sustancias, que en su mayoría son parte de la muestra y otras añadidas a la mezcla de reacción, pueden inhibir fuertemente la actividad de la polimerasa limitando así el empleo de la técnica del PCR. Entre estos inhibidores se incluyen los reactivos usados durante el paso de extracción y purificación del DNA, tales como el fenol y detergentes iónicos que pueden desnaturalizar dicha enzima (2,3). Lo anterior, junto con la propia tasa de error de la enzima *Taq* polimerasa, justifica la secuenciación de la muestra positiva en quintuplicado que se hizo en esta investigación. Finalmente, aquellos posibles errores son minimizados al alinear los resultados de la secuenciación y generar una secuencia consenso.

El objetivo general de esta memoria consistió en implementar el diagnóstico molecular de *Mycoplasma* spp. en cultivos celulares experimentales mediante el PCR. En relación a esta técnica, se describe al PCR anidado como una modificación del PCR y que es utilizada para incrementar la sensibilidad del ensayo en hasta 10 órdenes con respecto al PCR convencional. En un protocolo típico para un PCR anidado, una primera ronda de PCR es ejecutada con un par de partidores externos. Luego, una pequeña cantidad del producto de esta primera ronda es transferida a un nuevo tubo de reacción para una segunda ronda en la que se emplea un par de partidores interiores. La disminución del número de falsos negativos que se logra con el empleo del PCR anidado, le confiere mayor confiabilidad al método de monitoreo y reduce las posibilidades de cometer errores en la valoración de los resultados (1). Sin embargo, lo anteriormente expuesto no atenta contra el PCR género-específico utilizado en este estudio, ya que en el PCR anidado existe un riesgo sustancial de contaminación cruzada por parte de los productos de la primera ronda de amplificación que

son usados en la segunda ronda, resultando en la transferencia de material entre los distintos tubos de PCR (12).

Relacionado también a la contaminación en los laboratorios, una vez que se detecta un cultivo celular infectado con *Mycoplasma* spp., es recomendable su inmediata eliminación. Sin embargo, aquellos con especial valor de investigación pueden ser tratados (16). La eficacia de la eliminación de los micoplasmas de los cultivos celulares contaminados varía entre 71-86%, según el esquema antimicrobiano que se emplee. No obstante, la eficacia global de la descontaminación empleando más de un esquema si se produce una falla en la erradicación de los microorganismos frente a un tratamiento es de un 96%. Las fallas en erradicar los micoplasmas se deben a resistencia antimicrobiana (3-20%) o al efecto citotóxico del antimicrobiano empleado (3-11%). Los antimicrobianos más empleados corresponden a las tetraciclinas, las quinolonas y los macrólidos, teniendo en consideración que la sensibilidad a los distintos macrólidos difiere entre las especies de *Mollicutes* (1). Lo anterior, hace imprescindible a la etapa de secuenciación basándose en su diferenciación por especie en los cultivos celulares afectados.

Por último, pero no menos relevante, las 6 semanas de congelación a -20°C de las muestras controles no influyeron en la detección de *Mycoplasma* spp. mediante PCR, dado que todos los cultivos celulares positivos y negativos procesados resultaron como tal.

## **CONCLUSIONES**

La amplificación del gen 16S rRNA resultó adecuada para el diagnóstico de micoplasmas en cultivos celulares.

El PIN obtenido de un 97% permite indicar que la prueba es específica para la detección de *Mycoplasma* spp.

Esta técnica de diagnóstico tuvo los mismos resultados, ya sea usando extracción de DNA o aplicándola sin este procedimiento, lo que ofrece una variante más rápida, barata y simple de esta metodología de detección de micoplasmas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **AGÜERO, J.A.; CHÁVEZ, Y.; MARTÍNEZ, S.** 2004. Aplicación de un sistema de PCR-anidado a la evaluación de vacunas contra *Mycoplasma gallisepticum*. Rev Salud Anim. 26(1):35-41
2. **ALAEDDINI, R.** 2012. Forensic implications of PCR inhibition- A review. FSI: Genetics. 6(3):297-305.
3. **BAAR, C.; D`ABBADIE, M.; VAISMAN, A.; ARANA, M.; HOFREITER, M.; WOODGATE, R.; KUNKEL, T.; HOLLIGER, P.** 2011. Molecular breeding of polymerases for resistance to environmental inhibitors. Nucleic Acids Res. 39(8): 1-12.
4. **BIOLINE.** 2013. A Meridian Life Science<sup>®</sup> Company. [en línea] <[http://www.bioline.com/h\\_prod\\_detail\\_ld.asp?itemid=150](http://www.bioline.com/h_prod_detail_ld.asp?itemid=150)> [consulta: 18-04-2013].
5. **BROWNING, G.F.; MARENDA, M.S.; MARKHAM, P.F.; NOOMOHAMMADI, A.H.; WHITHEAR, K.G.** 2010. *Mycoplasma*. **In:** Gyles, C.L.; Prescott, J.F.; Songer, G.; Thoen, C.O. (Eds.). Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4<sup>a</sup> ed. Wiley-Blackwell. Iowa, Estados Unidos. pp. 549-571.
6. **CLOTHIER, K.; JORDAN, D.; THOMPSON, C.; KINYON, J.; FRANA, T.; STRAIT, E.** 2010. *Mycoplasma bovis* real-time polymerase chain reaction assay validation and diagnostic performance. J Vet Diagn Invest. 22(6):956–960.
7. **DVORAKOVA, H.; VALICEK, L.; REICHELOVA, M.** 2005. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. Vet Med-Czech. 50(6):262-268.
8. **FERNÁNDEZ, A.; GARCÍA, C.; SAÉZ, J.A.; VALDEZATE, S.** 2010. Métodos de Identificación Bacteriana en el Laboratorio de Microbiología. [en línea] **In:** Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. <<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>> [consulta: 09-07-2012]
9. **KONEMAN, E.; ALLEN, S.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W.** 2003. Diagnóstico Microbiológico. 5<sup>a</sup> ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 119-167.
10. **LEVY, S.; MCMURRY, L.; BARBOSA, T.; BURDETT, V.; COURVALIN, P.; HILLEN, W.; ROBERTS, M.; ROOD, J.; TAYLOR, D.** 1999. Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother. 43(6):1523–1524.
11. **LIERZ, M.; HAGEN, N.; HARCOURT-BROWN, N.; HERNANDEZ-DIVERS, S.J.; LUSCHOW, D.; HAFEZ, H.M.** 2007. Prevalence of mycoplasmas in eggs from

- birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 36(2):145-150.
12. **OIE.** 2008. Validation and Quality Control of Polymerase Chain Reaction Methods used for the Diagnosis of Infectious Diseases. **In:** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). 6<sup>a</sup> ed. OIE. Paris, Francia. pp. 46-55.
  13. **RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y.** 1998. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(4):1094–1156.
  14. **SAMBROOK, J.F.; RUSSELL, D.W.** 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, Estados Unidos. 2100 p.
  15. **SOBARZO, G.; MARTÍNEZ, M.A.; VIDAL, R.; MARTÍNEZ, M.C.; AVENDAÑO, L.** 2006. Detección de contaminación por *Mollicutes* en cultivos celulares mediante amplificación del gen 16S rARN. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 40(4):515-520.
  16. **TIMENETSKY, J.; SANTOS, L.M.; BUZINHANI, M.; METTIFOGO, E.** 2006. Detection of multiple *Mycoplasma* infection in cell cultures by PCR. *Braz J Med Bio Res.* 39(7):907-914.
  17. **UPHOFF, C.; DREXLER, H.** 2011. Detecting *Mycoplasma* Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction. **In:** Cree, I. (Ed.). *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols.* 2<sup>a</sup> ed. Humana Press. New York, Estados Unidos. pp. 93-103.
  18. **VAN KUPPEVELD, F.; VAN DER LOGT, J.; ANGULO, A.; VAN ZOEST, M.; QUINT, W.; NIESTERS, H.; GALAMA, J.; MELCHERS, W.** 1992. Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol.* 58(8):2606-2615.