

## Implementación de un control interno en la detección molecular de las principales especies de micoplasmas contaminantes de cultivos celulares

### Implementation of an internal control in molecular detection of the main mycoplasma species contaminating cell cultures

Juan D. Puerta<sup>1\*</sup>, José A. Usme-Ciro<sup>1,2,\*</sup>, Juan C. Gallego-Gómez<sup>1,2,3</sup>

#### Resumen

**Objetivo:** Construir e implementar un control interno para la detección molecular de micoplasmas en cultivos celulares.

**Materiales y métodos:** Se alinearon secuencias del RNA ribosomal 16S de las principales especies de micoplasmas reportadas como contaminantes de cultivos, y diseñaron oligonucleótidos para la detección de las mismas. Para la construcción del control interno se amplificó una secuencia espaciadora, además de las secuencias de hibridación de los oligonucleótidos usados para detección. La amplificación desde dicho control generó un fragmento con tamaño diferente al obtenido desde una muestra positiva. Posteriormente, para la evaluación del efecto del control interno sobre la amplificación de una muestra positiva se realizó la prueba sobre diluciones seriadas de la muestra, en presencia y ausencia del control interno. Finalmente, se ensayó el protocolo utilizando sobrenadantes de cultivo provenientes de diferentes laboratorios.

**Resultados:** Se observó alta homogeneidad al comparar los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma*; no obstante se realizó el diseño de oligonucleótidos degenerados para aumentar teóricamente la eficiencia en la detección de todas las especies. Se demostró que la aplicación del control interno no afecta la sensibilidad de detección de la prueba. Los resultados

Fecha de recepción: 27 de junio de 2013  
Fecha de aceptación: 21 de julio de 2013

<sup>1</sup> Viral Vector Core and Gene Therapy, Grupo de Neurociencias (SIU), Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia).

<sup>2</sup> Grupo de Medicina Molecular y de Translación, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia).

<sup>3</sup> Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia). Director del Viral Vector Core and Gene Therapy, Grupo de Neurociencias (SIU), Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia). Juanc.gallegomez@gmail.com.

\* Ambos autores contribuyeron de igual manera en este trabajo.

**Correspondencia:** Juan Carlos Gallego Gómez. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Edificio Histórico Manuel Uribe Ángel. Teléfono: 57 4 + 219 6014 / 02 - Fax: 57 4 + 219 6444. Medellín (Colombia). juanc.gallegomez@gmail.com

obtenidos con muestras problema resaltan la importancia del control interno al realizar la prueba desde sobrenadantes de cultivo.

**Conclusiones:** El uso del control interno evita la obtención de resultados falsos negativos, generados por presencia de inhibidores en la muestra. La implementación de la prueba beneficiará los laboratorios en cuyas investigaciones utilicen cultivos celulares y permitirá ejercer un control de calidad, lo cual hará más confiables los resultados/productos obtenidos.

**Palabras clave:** Detección molecular, PCR, control interno, micoplasma, contaminación, cultivos celulares.

### Abstract

**Objective:** to construct and implement an internal control for molecular detection of mycoplasma in cell cultures.

**Materials and Methods:** Sequences of 16S ribosomal RNA of the major species of mycoplasma reported as contaminants in cell cultures were aligned, and oligonucleotides for detection were designed. For the construction of the internal control, a spacer sequence as well as sequences for hybridization of the oligonucleotides used for detection, were amplified. Amplification from the internal control and positive samples generated fragments with different sizes. Subsequently, to evaluate the effect of the internal control on the amplification of a positive sample, the assay was performed on serial dilutions of the sample in the presence and absence of the internal control. Finally, the protocol was tested using culture supernatants from different laboratories.

**Results:** High homogeneity was observed when *Mycoplasma* and *Acholeplasma* genera were compared; however, degenerated oligonucleotides were designed to increase the efficiency of detection in all the analyzed species. It was shown that implementation of the internal control does not affect the sensitivity of detection. The results obtained with cell cultures samples highlighted the importance of the internal control.

**Conclusions:** The use of an internal control facilitates the detection of false negative results generated by the presence of inhibitors in the sample. Implementation of the test as a quality control will benefit laboratories using cell cultures, making the results and / or products obtained more reliable.

**Keywords:** Molecular Detection, PCR, Internal Control, Mycoplasma, Contamination, Cell Cultures.

## INTRODUCCIÓN

El uso rutinario de cultivos celulares se ha convertido en una realidad, no solamente en laboratorios de investigación científica, sino también en laboratorios de diagnóstico y desarrollo biotecnológico. Aunque en la actualidad se dispone de equipos sofisticados y áreas específicas para la manipulación de cultivos celulares en condiciones de esterilidad, la contaminación por agentes biológicos sigue siendo un problema, que repercute no solo en la pérdida del cultivo, sino también en todos los productos y/o resultados que deriven del mismo.

Es frecuente aislar bacterias y hongos ambientales como agentes contaminantes, los cuales son fácilmente detectados por los cambios macroscópicos (pH, turbidez) y microscópicos (morfología celular) que generan en el cultivo (1). Sin embargo, existen otros tipos de patógenos, igualmente importantes, que no son fácilmente detectables y que logran pasar inadvertidos por largos periodos de tiempo, entre los que se encuentran diversos virus y bacterias intracelulares conocidas como micoplasmas.

Los micoplasmas, pertenecientes a la clase *Mollicutes*, han sido divididos en 6 géneros: *Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma*, *Anaeroplasma* y *Asteroleplasma*, todos de importancia en salud humana, animal o vegetal. Aunque existen alrededor de 120 especies conocidas de micoplasmas, cerca de 20 especies han sido reportadas como contaminantes de cultivos celulares (2), de las cuales *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. orale*, *M. hyorhinitis* o *Acholeplasma laidlawii* han sido aisladas en el 95 % de los cultivos contaminados (3-5).

Las especies de micoplasmas se caracterizan por tener un genoma pequeño con poco contenido de GC (6). La carencia de una pared celular les confiere resistencia a muchos de los antimicrobianos más utilizados en cultivos celulares (7-9). Los micoplasmas son bacterias extremadamente pequeñas, su tamaño oscila entre 130 y 300 nm (6), son indetectables con el microscopio de luz y no filtrables con las membranas convencionales de diámetros de poro entre 220 y 450 nm.

Su tasa de replicación en el cultivo es lenta y la mayoría de especies no genera lisis total de las células infectadas, lo cual dificulta su detección temprana. Solo en aquellos cultivos celulares con infección crónica se pueden observar cambios en la morfología celular (10-12), disminución en la tasa de proliferación (13), alteración del metabolismo celular al competir por los nutrientes presentes en el medio (14, 15), regulación de la respuesta inmune (16), aglutinación de las células infectadas (17), así como también un aumento en la sensibilidad de las células a la infección viral y al tratamiento con drogas (18).

Algunas especies de micoplasmas, entre las que se encuentran *Mycoplasma orale*, *M. fermentans*, *M. salivarium* y *M. hominis*, están presentes como flora normal en el humano, y por ende, convierten al personal del laboratorio en posible fuente de contaminación (5). Otras fuentes importantes de contaminación que se deben considerar, dado su origen animal, son los reactivos como la tripsina o el suero fetal bovino no certificados para cultivos celulares, a partir de los cuales se han aislado principalmente las especies *M. hyorhinitis*, *M. arginini* y *Acholeplasma laidlawii* (5, 19).

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes métodos de detección, los cuales varían en complejidad, tiempo y equipamiento necesario. Anteriormente se utilizaban como métodos de rutina para la detección tinciones fluorescentes (tinción de Hoechst o DAPI) (20), autorradiografía con [3H] timidina (21), inmunofluorescencia indirecta (22, 23), o cultivo de colonias en agar sólido, las cuales deben ser vistas con microscopio, observando la característica apariencia de “huevo frito” en algunas especies (24).

Recientemente se ha desarrollado una variedad de inmunoensayos, sin embargo, la mayoría detecta un número reducido de especies, lo que limita la prueba, si se tiene en cuenta la cantidad de especies reportadas como contaminantes de cultivos celulares (24).

Actualmente las pruebas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las de mayor uso en los laboratorios, puesto que tienen una alta sensibilidad y abarcan un amplio número de especies contaminantes, dependiendo de la región genómica escogida para la amplificación y el diseño de oligonucleótidos degenerados (18, 23, 25). Para la detección de micoplasmas en cultivos celulares se han publicado múltiples protocolos, cada uno con condiciones de especificidad, sensibilidad y simplicidad diferentes (8, 19, 23, 24, 26-30).

Aunque el mayor atractivo de la PCR para la detección de micoplasmas en cultivos celulares es su alta sensibilidad, lo cual permite el uso directo de sobrenadantes como fuente de DNA, sin la necesidad de pasos previos de lisis (por calor o con detergentes) y extracción de ácido nucleico (que incremen-

tan los costos y el tiempo requerido para la obtención del resultado), se debe considerar también que la presencia de sales u otras sustancias en algunas muestras podría causar la inhibición de la PCR, y por tanto, la obtención de resultados falsos negativos.

Por tal motivo se ha venido implementando el uso de un Control Interno (CI) dentro de la reacción de PCR (19, 23, 27, 31, 32), lo cual permite validar los resultados obtenidos de una muestra negativa o detectar alguna falla (por inhibición) en la PCR.

Dicha metodología ha sido implementada también en el diagnóstico molecular de un amplio rango de agentes infecciosos (33-35), principalmente en aquellos casos en los que se utiliza directamente la muestra proveniente del paciente (orina, esputo, suero), la cual podría presentar inhibidores de la reacción.

En este estudio se presenta la construcción e implementación de un CI para la detección molecular de micoplasmas a partir de cultivos celulares. Los resultados demuestran su utilidad y desempeño a diferentes concentraciones, así como la carencia de efectos negativos en la sensibilidad de la detección. Finalmente, se pone a disposición dicho CI y se recomienda su implementación para la evaluación periódica de la presencia de micoplasma en cultivos celulares.

## METODOLOGÍA

### 1. Diseño de oligonucleótidos

Se alinearon secuencias de DNA que codifican para el RNA ribosomal 16S, reportadas para las especies *M. hyorhina* (Número de Acceso GenBank: AF258792), *M. salivarum*

(M24661), *M. orale* (M24659), *M. arginini* (M24579), *M. fermentans* (NC\_014921), *M. buccale* (MBU83502), *M. hominis* (NC\_013511.1) y *Acholeplasma laidlawii* (CP000896), utilizando el paquete Clustal X2 (36), con los parámetros por defecto y corrección por alineamiento manual. Teniendo en cuenta la heterogeneidad de las secuencias utilizadas, se optimizó el oligonucleótido MYB previamente diseñado (37), por medio de la introducción de sitios degenerados y para mejorar teóricamente la eficiencia de hibridación en la especie *A. laidlawii*, como miembro importante de micoplasmas contaminantes.

## 2. Diseño y construcción del Control Interno

Para el diseño del CI se utilizó una secuencia espaciadora proveniente del Virus Dengue 2 NGC, la cual fue amplificada con los oligonucleótidos CI\_MYA\_F (5'-gagaagctt**ggc-gaatgggtgagtaacacgaccaacgccggaaccata**-3') y CI\_MYB\_R (5'-gaggaatt**cggataacgcttgacacctgctgectcaccatctcta**-3'). La región subrayada corresponde a la secuencia de los oligonucleótidos MYA y MYB, situados en su extremo 5' correspondiente. La región 3' (en cursiva) permitió la amplificación específica a partir del genoma de Virus Dengue.

La mezcla de reacción de PCR (25 µl) consistió en 75 mM Tris-HCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01%(v/v) Tween 20, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmoles de cada oligonucleótido, 400 µM de cada dNTP, 1,25 unidades de *Taq* DNA Polimerasa (fermentas) y 1 µl de DNA plasmídico (genoma de Virus Dengue clonado. Datos no publicados). Se utilizó el siguiente perfil térmico: 94°C por 5 minutos (desnaturalización inicial), seguido por 35 ciclos 94°C por 1 minuto (desnaturalización), 50°C por 1 minuto (*annealing*), 72°C por 1 minuto (extensión) y un ciclo de extensión final

de 72°C por 10 minutos. El producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y visualizado bajo luz ultravioleta. El tamaño esperado del fragmento fue de 638 pb.

El fragmento obtenido fue posteriormente purificado a partir del gel de agarosa por medio del estuche comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Para la clonación en el vector pGEM-T easy (Promega) se usaron 5 unidades de T4 DNA ligasa (fermentas) y una proporción 1:1 de inserto:vector. El producto de ligación fue usado para la transformación de bacterias *E. coli* DH5-α ultracompetentes (38). Posteriormente, las colonias recombinantes seleccionadas con el antibiótico ampicilina fueron expandidas en medio LB líquido y el DNA plasmídico purificado por medio del estuche comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Los clones positivos fueron chequeados por PCR y secuenciación (Macrogen Inc. Corea).

## 3. Evaluación del efecto del Control Interno sobre la sensibilidad de la prueba para la detección de micoplasmas

### *Sensibilidad en la detección del Control Interno*

Se realizaron diluciones seriadas del CI, de la siguiente forma: 100ng/µl (2,55\*10<sup>10</sup> moléculas del plásmido) - 1\*10<sup>-8</sup>ng/µl. Para cada reacción se utilizó 1 µL de la dilución correspondiente. Con este ensayo se determinó la máxima sensibilidad de la técnica y la concentración de plásmido que debe ser utilizada en posteriores experimentos. Las condiciones de reacción de PCR fueron las mismas utilizadas anteriormente, excepto por la utilización de los oligonucleótidos

MYA y MYB\_D. El perfil para esta reacción fue: 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 40 segundos y un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % y visualizados bajo luz ultravioleta. El tamaño esperado del fragmento fue de 638 pb.

#### ***Sensibilidad de detección de una muestra positiva***

Utilizando una muestra positiva, previamente evaluada por otro método (datos no publicados), se realizaron diluciones seriadas 1/10 - 1/10.000. Las condiciones de PCR fueron las mismas utilizadas en la detección del CI. El tamaño del fragmento esperado fue entre 438 y 465 pb.

#### ***Efecto del Control Interno en la sensibilidad de detección de una muestra positiva***

Una vez determinada la cantidad óptima de DNA plasmídico del CI, se realizó una nueva reacción con 0.001 pg del CI y diluciones seriadas de una muestra positiva para micoplasma. Las condiciones de la PCR fueron las mismas utilizadas en los ensayos anteriores. Los tamaños del fragmento esperados fueron de 438 - 465 pb (muestra positiva) y 638 pb (CI).

#### **4. Prueba piloto de detección de micoplasma en muestras problema**

Se utilizaron muestras problema, provenientes de varios grupos de investigación. Para cada muestra se adicionó 1 pg de CI y se realizó la PCR bajo las mismas condiciones de reacción utilizadas en los ensayos previos.

## **RESULTADOS**

### **Oligonucleótidos para la detección de micoplasmas**

Para el diseño de los oligonucleótidos se tuvieron en cuenta las especies frecuentemente reportadas como contaminantes de cultivos celulares (figura 1). Con las secuencias del gen del RNA ribosomal 16S alineadas se delimitó la región de hibridación de los oligonucleótidos, previamente diseñados (37), y se establecieron las modificaciones necesarias para cubrir la variabilidad presente en estos, así como para permitir la inclusión de *A. laidlawii*.

Al realizar el alineamiento se observó una alta homogeneidad en la región de hibridación para ambos oligonucleótidos, MYA y MYB, en todas las especies analizadas. No obstante, fue necesaria la inclusión de sitios degenerados cerca al extremo 3' del primer reverso MYB, teniendo en cuenta la frecuencia de purinas (adenina, guanina) o pirimidinas (timina, citosina) presentes en ellas y con el fin de obtener una mayor eficiencia en la amplificación de las diferentes especies de micoplasmas. La secuencia del oligonucleótido posterior a la inclusión de los sitios degenerados fue: MYB\_D 5'-CGA-TAACGCYCVMCCTATG-3'. Donde (Y) equivale a 87,5 % de timina y 12,5 % de citosina; (V) a 87,5 % de purinas y 12,5 % de citosina y (M) a 87,5 % de adenina y 12,5 % de citosina.

### **La inclusión del Control Interno no afecta la sensibilidad del método**

Luego de la construcción del CI (figura 2) fue necesario evaluar su efecto en la sensibilidad de la prueba de detección de *Mycoplasma spp* al ser implementado. Inicialmente se deter-

minó la cantidad mínima de moléculas de plásmido (CI) para utilizar en cada reacción.

Como se evidencia en la figura 3A, utilizando una mínima cantidad de moléculas por reacción (2,55 moléculas) se logró observar la banda del tamaño esperado, lo cual demuestra no solo la alta sensibilidad del método, sino también la eficacia de los oligonucleótidos previamente diseñados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se utilizará la concentración de 1 pg de CI por reacción en los posteriores experimentos. Posteriormente se evaluó la sensibilidad de la prueba, utilizando diluciones seriadas de una muestra positiva, proveniente de un cultivo celular contaminado con micoplasma, en la cual se obtuvo amplificación hasta la dilución 1/100 (figura 3B).

Finalmente se evaluó el efecto del CI sobre la sensibilidad en la amplificación de una muestra positiva al adicionarlo en el mismo tubo de reacción. El resultado obtenido demuestra la amplificación de la muestra positiva en las mismas diluciones del ensayo anterior.

No obstante, en la máxima dilución se observa una leve disminución en la intensidad de la banda del fragmento obtenido (figura 3C). Estos resultados apoyan la implementación del CI como herramienta para descartar posibles “falsos negativos”, generados por la presencia de inhibidores de la reacción provenientes de la muestra problema.

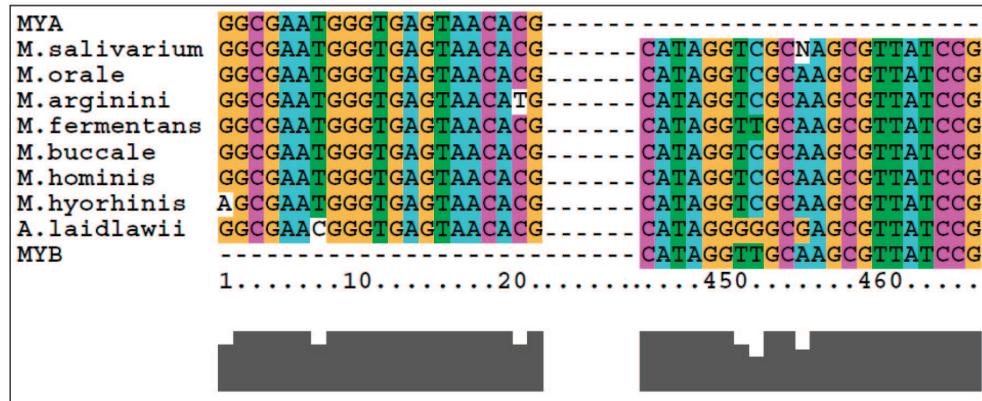
### **Prueba piloto para la detección de micoplasmas**

Utilizando muestras problema, provenientes de cultivos celulares, se realizó la PCR para la detección de micoplasma adicionando a cada tubo de reacción 1 pg de CI (figura 4).

El resultado demostró la eficacia de la prueba para detectar la presencia de micoplasma y evidencia además la utilidad de la implementación del CI.

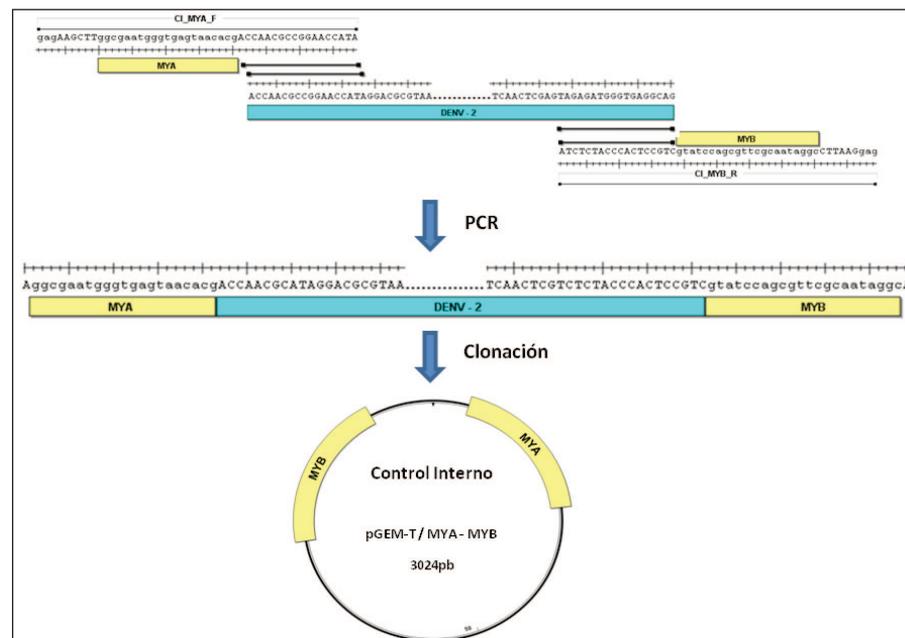
En el carril 4 de la figura se observa una muestra con resultado negativo, en la cual no hubo amplificación del CI. Este resultado, al ser reproducible (n=3), sugiere la presencia de inhibidores de la PCR en dicha muestra y la convierte, por ende, en un potencial “falso negativo”.

Este tipo de muestras requiere un tratamiento especial e idealmente la extracción de DNA total a partir del cultivo celular, previo a la prueba de detección molecular de micoplasmas.



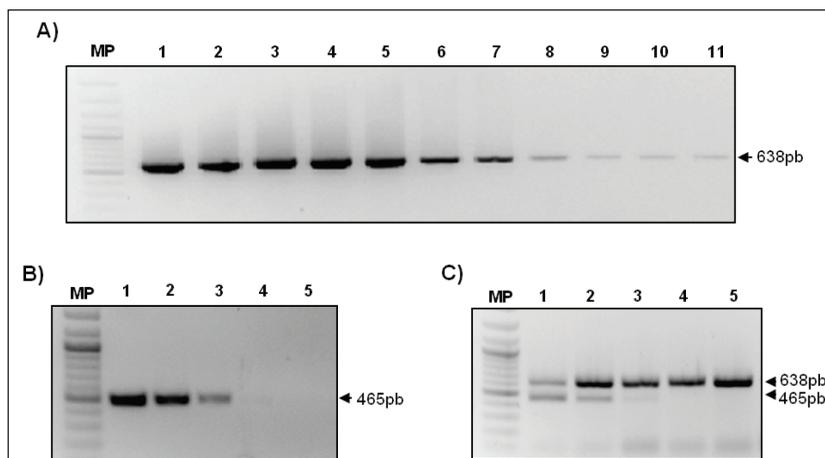
Fuente: propia de los autores.

**Figura 1.** Alineamiento de las regiones de hibridación de los oligonucleótidos MYA y MYB en secuencias de RNA ribosomal 16S de diferentes especies de micoplasma.



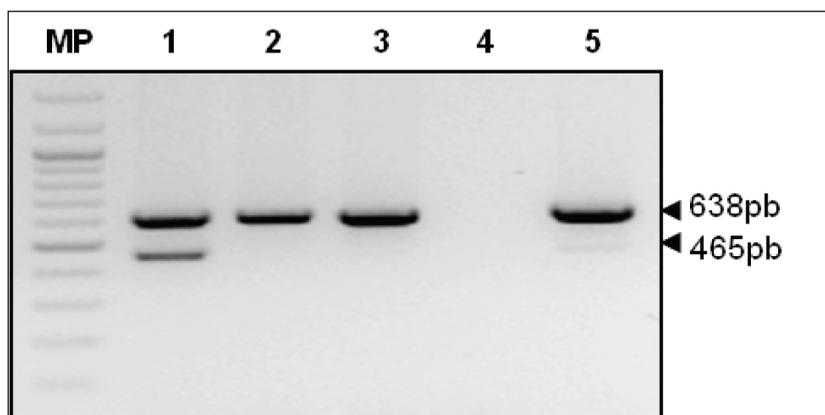
Fuente: propia de los autores.

**Figura 2.** Construcción del Control Interno. Utilizando los oligonucleótidos CI\_MYA\_F y CI\_MYB\_R se amplificó una secuencia espaciadora proveniente del Virus Dengue. El fragmento obtenido fue insertado en el vector pGEM-T easy. El plásmido recombinante obtenido posee además las secuencias de hibridación para los oligonucleótidos MYA y MYB\_D.



Fuente: propia de los autores.

**Figura 3.** Efecto del Control Interno sobre la amplificación de una muestra positiva para micoplasma. **A)** Sensibilidad en la detección del Control Interno: la PCR fue realizada con diferentes concentraciones del Control Interno: desde 100 ng ( $2,55 \cdot 10^{10}$  moléculas) - carril 1 hasta  $1 \cdot 10^{-8}$  ng (2,55 moléculas) - carril 11. El tamaño esperado de la banda fue de 638 pb. **B)** Sensibilidad en la detección de una muestra positiva: la PCR fue realizada con diluciones seriadas de una muestra positiva para micoplasma. Carril 1 (muestra sin diluir), carriles 2 - 5 (diluciones 1/10 a 1/10.000). El tamaño del fragmento esperado fue de 465 pb. **C)** Efecto del control interno en la sensibilidad de detección de muestra positiva: la PCR fue realizada con diluciones seriadas, carril 1 (1/10) - carril 4 (1/10.000) de una muestra positiva y 0,001 ng del CI por reacción. El tamaño de los fragmentos esperados fue de 465 pb (muestra positiva) y 638 pb (CI). MP: Marcador de peso molecular 100 pb.



Fuente: propia de los autores.

**Figura 4.** Prueba piloto de detección de micoplasmas a partir de sobrenadantes de cultivos celulares. La PCR fue realizada a partir de muestra problema con 0,001 ng del CI por reacción. El tamaño de los fragmentos esperados fue de 465 pb (muestra problema) y 638 pb (CI). MP: Marcador de peso molecular 100 pb.

## DISCUSIÓN

La contaminación por micoplasmas en cultivos celulares es, sin duda, uno de los problemas más importantes en los laboratorios a nivel mundial. Su presencia, además de poner en riesgo la viabilidad del cultivo afectado, conlleva la obtención de resultados, diagnósticos y productos biológicos (citoquinas y anticuerpos) poco confiables (5). De ahí la importancia de realizar de manera rutinaria en el laboratorio pruebas de detección que permitan hallar oportunamente cultivos y/o reactivos contaminados con micoplasmas (19, 24, 29).

Hasta ahora se han desarrollado muchas técnicas para la detección de micoplasmas en cultivos celulares, siendo las más utilizadas aquellas basadas en la técnica de PCR, debido a sus múltiples ventajas, entre las que se incluyen su alta sensibilidad, especificidad y facilidad de implementación en la mayoría de laboratorios.

Aunque las especies de micoplasmas de mayor importancia en cultivos celulares, pertenecientes a los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma*, muestran alta homogeneidad a nivel de secuencias nucleotídicas, la eficiencia en la amplificación podría ser incrementada mediante la inclusión de varias parejas de oligonucleótidos (8, 20, 28, 39) o mediante el uso de oligonucleótidos degenerados (25, 27), como es el caso del oligonucleótido MYB\_D, en el cual la inclusión de sitios degenerados cerca al extremo 3' asegura el "annealing" completo en los genomas de las especies de mayor importancia, así como también de aquellas especies no tan frecuentes pero que igualmente implican un riesgo para el laboratorio.

Adicional a esto, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en diferentes estudios en los que se demuestra el beneficio que se obtiene al utilizar un CI dentro de cada reacción, debido a que aumenta la probabilidad de detectar resultados "falsos negativos" (40-41), se planteó el desarrollo de un CI, el cual podría ser usado en el mismo tubo de reacción en el que se evalúa la muestra problema, ya que amplifica un fragmento que difiere en tamaño con respecto a una muestra positiva sin afectar la eficiencia de la reacción.

El uso de 1 pg de CI no mostró disminución significativa de la sensibilidad en la detección, como se observa en los resultados obtenidos con la muestra positiva; sin embargo, estudios futuros deberían enfocarse en demostrar el efecto de diferentes concentraciones de CI sobre la sensibilidad de la técnica.

Igualmente, este tipo de control es especialmente útil en pruebas como la aquí presentada, puesto que no se utiliza DNA purificado, sino sobrenadantes de cultivo, los cuales eventualmente podrían contener inhibidores de la reacción y llevar a la obtención de resultados "falsos negativos". La implementación de dicho control también permite disminuir el riesgo de obtención de resultados "falsos positivos" por contaminación cruzada al manipular muestras de cultivos contaminados con micoplasmas como controles positivos de reacción.

Aunque la mayoría de protocolos basados en el método de PCR consideran necesario realizar pasos previos de extracción o purificación del DNA, estos pasos implicarían un gasto adicional de tiempo y dinero, y se convierten en la principal limitante para su

implementación como prueba de uso rutinario.

Por lo tanto, en este estudio se presenta un protocolo basado en PCR, de rápida ejecución, el cual no requiere pasos previos de purificación de DNA. Cabe resaltar que aunque teóricamente la sensibilidad puede ser menor al utilizar sobrenadantes de cultivo como fuente de DNA molde para la PCR, en lugar de DNAs purificados, al ser un protocolo versátil, económico y de fácil realización podría ser implementado de manera periódica en los laboratorios, y por ende, aumentaría la probabilidad de detectar dichas muestras positivas que inicialmente fuesen consideradas negativas.

En conclusión, la implementación de la prueba molecular para la detección de micoplasmas, incluyendo la utilización del CI, beneficiará a gran cantidad de laboratorios cuyas investigaciones se basen en el uso de cultivos celulares. Dicha prueba permitirá ejercer un control de calidad de las líneas celulares (certificándolas como libres de micoplasmas) y hará más confiables los resultados y/o productos derivados de las mismas.

**Agradecimientos:** A los diferentes grupos de investigación que facilitaron muestras para el análisis.

**Conflictos de intereses:** Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

**Financiación:** Esta investigación fue financiada por la Universidad de Antioquia y el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), mediante los proyectos 1115-45921525, 1115-40820511 y 1115-49326198.

## REFERENCIAS

- (1) Razin S, Tully JG. *Molecular and Diagnostic procedures in Mycoplasmaology*. San Diego, CA: Academic Press; 1996. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125838054>
- (2) Wirth M, Berthold E, Grashoff M, Pfuotner H, Schubert U, Hauser H. Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. *Cytotechnology* 1994;16(2):67-77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765790>
- (3) McGarrity GJ. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch L, editors. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC.: ASM Press; 1992. p. 445-54. Disponible en: [http://books.google.com.co/books?id=G3rURFq6u84C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.co/books?id=G3rURFq6u84C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- (4) Garner CM, Hubbard LM, Chakraborti PR. Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. *Br J Biomed Sci* 2000; 57(4):295-301. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204859>
- (5) Rawadi G, Dussurget O. Advances in PCR-based detection of mycoplasmas contaminating cell cultures. *PCR Methods Appl* 1995 Feb;4(4):199-208. Disponible en: <http://genome.cshlp.org/content/4/4/199.full.pdf+html>
- (6) Stanbridge E. Mycoplasmas and cell cultures. *Bacteriological reviews* 1971 Jun; 35(2):206-27. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC378381/>
- (7) Fleckenstein E, Uphoff CC, Drexler HG. Effective treatment of mycoplasma contamination in cell lines with enrofloxacin (Baytril). *Leukemia* 1994 Aug; 8(8):1424-34. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520103>
- (8) Molla Kazemiha V, Shokrgozar MA, Arabestani MR, Shojaei Moghadam M, Azari

- S, Maleki S et al. PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology* 2009 Dec; 61(3):117-24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20135349>
- (9) Taylor-Robinson D, Bebear C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *J Antimicrob Chemother* 1997 Nov; 40 (5): 622-30. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9421309>
- (10) Razin S, Yagev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998 Dec;62(4):1094-156.
- (11) Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol Rev* 2003 Apr; 83(2):417-32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663864>
- (12) Rottem S, Barile MF. Beware of mycoplasmas. *Trends Biotechnol* 1993 Apr; 11(4):143-51. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016777999390089R>
- (13) Stanbridge EJ, Weiss RL. Mycoplasma capping on lymphocytes. *Nature* 1978 Dec 7; 276(5688):583-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/723942>
- (14) Baseman JB, Lange M, Criscimagna NL, Giron JA, Thomas CA. Interplay between mycoplasmas and host target cells. *Microb Pathog* 1995 Aug; 19(2):105-16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577234>
- (15) Izutsu KT, Fatherazi S, Belton CM, Oda D, Cartwright FD, Kenny GE. Mycoplasma orale infection affects K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> currents in the HSG salivary gland cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996 Jun; 32(6): 361-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8842750>
- (16) Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol* 1999 Dec; 7(12): 493-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X99016418>
- (17) Giron JA, Lange M, Baseman JB. Adherence, fibronectin binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by Mycoplasma penetrans. *Infect Immun* 1996 Jan; 64(1): 197-208. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173746/>
- (18) Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002 Feb; 38(2): 79-85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11928999>
- (19) Dvorakova LV, Reichelova M. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures and bovine sera. *Journal Veterinary Medicine* 2005; 50(6): 262-8. Disponible en: <http://vri.cz/docs/vetmed/50-6-262.pdf>
- (20) Doyle A, Griffiths JB. Mycoplasma: Detection methods using PCR. In: Doyle A, Griffiths JB, editors. *Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology*. London, UK: Jhon Wiley & Son; 1998. p. 50-2. Disponible en: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471982555.html>
- (21) Nardone RM, Todd J, Gonzalez P, Gaffney EV. Nucleoside incorporation into strain L cells: inhibition by pleuropneumonia-like organisms. *Science* 1965 Sep 3; 149 (3688): 1100-1. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5826523>
- (22) Chou SY, Chung TL, Chen RJ, Ro LH, Tsui PI, Shiuan D. Molecular cloning and analysis of a HSP (heat shock protein)-like 42 kDa antigen gene of Mycoplasma hyopneumoniae. *Biochem Mol Biol Int* 1997 Apr; 41(4):821-31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111943>
- (23) Roulland-Dussoix D, Henry A, Lemerciera B. Detection of mycoplasmas in cell cultures by PCR: a one year study. *Journal of mi-*

- crobiological methods* 1994; 19(2): 127-34. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167701294900442>
- (24) Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature protocols* 2010; 5(5): 929-34. Disponible en: <http://www.nature.com/nprot/journal/v5/n5/abs/nprot.2010.43.html>
- (25) Volokhov DV, Kong H, George J, Anderson C, Chizhikov VE. Biological enrichment of Mycoplasma agents by cocultivation with permissive cell cultures. *Applied and environmental microbiology* 2008 Sep; 74(17): 5383-91. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606798>
- (26) Miserez R, Pilloud T, Cheng X, Nicolet J, Griot C, Frey J. Development of a sensitive nested PCR method for the specific detection of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC. *Molecular and cellular probes* 1997 Apr; 11(2): 103-11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160324>
- (27) Sánchez-Seco MP, Rosario D, Domingo C, Hernández L, Valdés K, Guzmán MG et al. Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *Journal of virological methods* 2005 Jun; 126 (1-2): 101-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016609340500042X>
- (28) 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 Jan; 39(2): 121-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10576701>
- (29) Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Brazilian journal of medical and biological research* 2006 Jul; 39 (7): 907-14. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2006000700009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2006000700009)
- (30) Uphoff CC, Drexler HG. Detecting Mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2011; 731:93-103. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21516400>
- (31) Uphoff CC, Hu ZB, Gignac SM, Ma W, Rainey FA, Kreutz M et al. Characterization of the monocyte-specific esterase (MSE) gene. *Leukemia* 1994 Sep; 8(9): 1510-26. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8090031>
- (32) Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol* 2004 May; 42(5):1863-8. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/42/5/1863.full>
- (33) Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, DeBonville D, Spadaro JP. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol* 1998 Jan;36(1):191-7. Disponible en: <http://jcm.asm.org/content/36/1/191.abstract>
- (34) Betsou F, Beaumont K, Sueur JM, Orfila J. Construction and evaluation of internal control DNA for PCR amplification of Chlamydia trachomatis DNA from urine samples. *J Clin Microbiol* 2003 Mar; 41(3):1274-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150278/>
- (35) Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. [Assessment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007 Jan; 25(1):16-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17261242>
- (36) Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* (Oxford, England) 2007 Nov 1; 23(21):2947-8. Disponible en: <http://>

bioinformatics.oxfordjournals.org/content/23/21/2947.abstract

- (37) Wong-Lee JG, Lovett M. Rapid and sensitive PCR method for identification of mycoplasma species in tissue culture. In: Persing D, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic Molecular and Microbiology Principles and Applications*. Washington, D.C.: ASM Press; 1993. p. 257-60. Disponible en: <http://www.sigmaldrich.com/catalog/product/sigma/z369861?lang=en&region=CO>
- (38) Sambrook J, Russell D. *The Condensed protocols from Molecular Cloning*. Melbourne, Australia: Cold Spring harbor Laboratory Press; 2006. Disponible en: <http://goo.gl/1wMzGO>
- (39) Uphoff CC, Drexler HG. Detection of Mycoplasmas contaminations. In: Helgason CD, Miller CL, editors. *Basic Cell Culture Protocols*. Human Press Inc; 2004. p. 13-23. Disponible en: [http://books.google.com/books/about/Basic\\_Cell\\_Culture\\_Protocols.html?id=VuL0PLBuJlkC&redir\\_esc=y](http://books.google.com/books/about/Basic_Cell_Culture_Protocols.html?id=VuL0PLBuJlkC&redir_esc=y)
- (40) Cubero J, van der Wolf J, van Beckhoven J, López MM. An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR. *J Microbiol Methods* 2002 Nov; 51(3): 387-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223299>
- (41) Sohni Y, Kanjilal S, Kapur V. Cloning and development of synthetic internal amplification control for Bacillus anthracis real-time polymerase chain reaction assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008 Aug; 61(4): 471-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18513914>