

Contaminación por micoplasmas en cultivos celulares

José Antonio Rivera-Tapia,* Guillermo Muñoz Zurita,* Cristian Román Méndez**

RESUMEN

Los cultivos celulares frecuentemente se contaminan con diferentes especies de micoplasmas, alterando el crecimiento celular, los patrones enzimáticos, la composición de la membrana e induciendo anomalías cromosómicas. Esta situación señala la necesidad de establecer un control de calidad para la detección de contaminación en cultivos celulares por micoplasmas. **Objetivo:** Detección de micoplasmas en cultivos celulares provenientes de distintos laboratorios biomédicos. **Material y métodos:** Los cultivos celulares que se utilizaron provenían de distintos laboratorios biomédicos. Los cultivos celulares fueron crecidos en ausencia de antibióticos y lavados con una solución de PBS. La monocapa celular se obtuvo por medio de un raspado y resuspendida en 2 mL de caldo SP-4. Las muestras incluidas en la detección por cultivo microbiológico fueron analizadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). **Resultados:** El estudio microbiológico mostró que 62.5% de los cultivos fueron positivos para el aislamiento de micoplasmas y 37.5% negativos. Por medio de la prueba de PCR se amplificó el fragmento específico (301 pb) para el género micoplasma. **Conclusión:** Debido a que los micoplasmas frecuentemente contaminan cultivos celulares, se sugiere la detección continua de estos microorganismos, principalmente en laboratorios biomédicos.

Palabras clave: Micoplasmas, cultivos celulares, contaminación, diagnóstico microbiológico, PCR.

ABSTRACT

Cell cultures can be contaminated with species belonging to the mycoplasma genus. Contaminating mycoplasmas may alter host cellular characteristics, for instance, alterations in growth characteristics, enzyme patterns, cell membrane composition and chromosomal abnormalities. These drawbacks emphasize the need to regularly screen cell cultures for mycoplasmal contamination. Objective: Mycoplasma detection in cell cultures came from several biomedical laboratories. Material and methods: Cells culture, were grown in absence of antibiotic and washed with PBS solution. Monolayer cells were first scraped off and suspended in 2 mL of SP-4 broth. Samples included in the microbiological culture were analyzed by PCR. Results: The microbiological study showed that 62.5% of the cultures was positive for the mycoplasma isolated and 37.5% negative. PCR technique determined the specific fragment (301 bp) for the mycoplasma genus. Conclusion: Because the mycoplasma frequently contaminate cell cultures, continuous detection is suggested, mainly in biomedical laboratories.

Key words: *Mycoplasma, cell cultures, contamination, microbiological diagnosis, PCR.*

INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares son utilizados en la investigación biotecnológica, biomédica y en el diagnóstico hospitalario, siendo en este último campo don-

de se recomienda un control constante para evitar la contaminación, ya que se involucra en el diagnóstico de la salud pública. Los cultivos celulares frecuentemente se contaminan con diferentes especies de micoplasmas, lo cual altera el crecimiento celular, los patrones enzimáticos, la composición de la membrana e induce anomalías cromosómicas. Dichas alteraciones influyen considerablemente en la toma de decisiones de los resultados obtenidos, además de pérdidas económicas y de tiempo. Esta situación hace énfasis en la necesidad de establecer un control de calidad para la detección de contaminación en cultivos celulares por micoplasmas, ya que el propagar, mantener y utili-

* Laboratorio de Micoplasmas del Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

** Laboratorio de Microbiología Oral, Facultad de Estomatología, BUAP.

Recibido: 01/08/06. Aceptado: 19/08/06

Correspondencia: M. en C. José Antonio Rivera Tapia

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Instituto de Ciencias Edificio 76, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, Puebla, México.
E-mail: jart70@yahoo.com

zar durante varios pasos a los cultivos celulares los hace un escenario susceptible de contaminación por micoplasmas.¹⁻³

Los micoplasmas son un grupo de microorganismos que pertenecen a la clase *Mollicutes* y se caracterizan por ser los procariontes más pequeños de vida libre hasta ahora descritos. Carecen de pared celular, el tamaño de su genoma oscila entre 577 y 2220 kpb, son exigentes desde el punto de vista nutricional y difíciles de cultivar.⁴

Los métodos para detección de contaminación por micoplasmas son el cultivo microbiológico, técnicas de microscopia, métodos bioquímicos y uso de técnicas de biología molecular. El cultivo de micoplasmas puede requerir de dos a cuatro semanas y se pueden presentar dificultades a causa de las condiciones especiales de crecimiento que requieren estos microorganismos.^{5,6} De tal forma, el uso de técnicas moleculares ha demostrado ser una vía rápida de diagnóstico, con una detección límite de aproximadamente 10^4 microorganismos.⁷⁻⁹ La detección de contaminación en los cultivos celulares por micoplasmas debe incluir la comparación de los resultados por cultivo microbiológico y técnicas moleculares.¹⁰⁻¹² El objetivo del presente trabajo es la detección de micoplasmas en cultivos celulares provenientes de distintos laboratorios biomédicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares. Los cultivos celulares que se utilizaron en el presente estudio provinieron de diferentes laboratorios biomédicos. Los cultivos celulares evaluados fueron riñón de hámster dorado (BHK-21), pulmón fetal humano (MRC-5), carcinoma humano (Hep-2), riñón de mono verde africano (Vero C-76), riñón bovino (MDBK), riñón de conejo (RK 13), tejido conectivo de ratón (L929) y embrión de ratón (3T3 L1).

Detección de micoplasmas por cultivo microbiológico. Los cultivos celulares fueron crecidos en ausencia de antibióticos durante cuatro días y lavados con una solución de PBS. La monocapa celular se obtuvo por medio de un raspado (0.5 mL de muestra) y resuspendida en 2 mL de caldo SP-4, incubándose las muestras a 37 °C durante

una semana. Diariamente se realizaron resiembras (5 µL) en agar SP-4, incubándose a 37 °C durante una semana y realizándose observación con microscopio estereoscópico. El total de muestras incluidas en la detección por cultivo microbiológico fueron analizadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Extracción de ADN. De cada una de las muestras se centrifugó 1 mL a 16,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos a 4 °C; el botón resultante se resuspendió en 50 µL de solución A (10 mM Tris HCl pH 8.3, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂) y 50 µL de solución B (10 mM Tris HCl ph 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 1% Tween 20, 1% Triton X-100) y 120 µg de proteinasa K por mililitro, incubándose durante una hora a 60 °C, enseguida se llevó a 94 °C por 10 minutos, conservándose a 4 °C.

Detección por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los iniciadores AR1 y AR2 utilizados amplifican un fragmento de 301 pb, reconociendo una secuencia conservada del ARNr en 30 especies de micoplasmas.¹³ La secuencia del iniciador AR1 es 5' ATG RGG RTG CGG CGT ATT AG 3' y la del iniciador AR2 es 5' CKG CTG GCA CAT AGT TAG CCRT 3', donde K representa una mezcla de los nucleótidos G-T y R de A-G.

Las muestras se amplificaron en un termociclador programable (mini Cycler MJ Research, INC. Watertown. Ma., USA). La mezcla de reacción contiene 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 200 µM de cada dNTP's, 50 mM de KCl, 3.5 mM de MgCl₂, 2.5 U de enzima Taq polimerasa, 0.3 µM de cada iniciador (Gibco BRL) y una gota de aceite de mineral estéril, para un volumen final de 50 µL de muestra. La amplificación se realiza bajo el siguiente esquema: desnaturización inicial a 95 °C durante cinco minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturización a 95 °C durante un minuto, alineación de los iniciadores a 50 °C durante un minuto y polimerización a 72 °C durante un minuto, finalmente se da una extensión a 72 °C durante cinco minutos. Se preparó un gel al 2% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL), colocándose 8 µL de cada uno de los productos amplificados más 2 µL de azul de bromofenol, el corrimiento electroforético se realizó a 70 voltios durante 90 minutos y los resultados se observaron en un analizador de imágenes (SYNGENE).

RESULTADOS

Los datos obtenidos por medio del estudio microbiológico mostraron que 15 (62.5%) de los 24 cultivos fueron positivos para el aislamiento de micoplasmas; mientras que en los nueve (37.5%) restantes no se logró el aislamiento (*Cuadro I*). En 12 (80%) de los 15 cultivos en caldo SP-4 se presentó el vire del indicador de pH a las 72 horas, el restante 20% no presentó el vire. Sin embargo, al realizar la resiembra del medio líquido al medio sólido se observó crecimiento característico de las colonias de micoplasmas en las 15 muestras (*Figura 1*). Por medio de la prueba de PCR se amplificó el fragmento específico (301 pb) para el género micoplasma, confirmándose los aislamientos en los

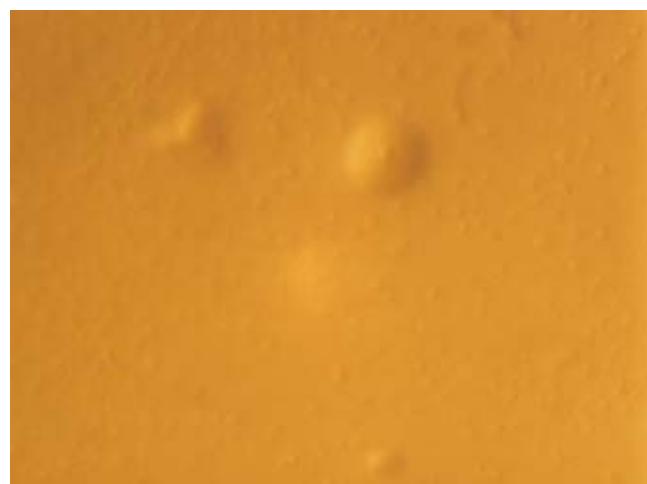


Figura 1. Crecimiento colonial característico de micoplasmas en agar, muestra aislada de cultivo celular (MDBK) contaminado por micoplasmas.

Cuadro I. Comparación de los resultados del cultivo microbiológico y el análisis por PCR en los cultivos celulares.

Cultivo celular	Medio líquido	Medio sólido	Análisis con PCR
MDBK	+	+	+
MDBK	+	+	+
MDBK	+	+	+
MDBK	-	-	+
MDBK	-	-	-
Vero C-76	+	+	+
Vero C-76	+	+	+
Vero C-76	+	+	+
Vero C-76	+	+	+
Vero C-76	+	+	+
Vero C-76	+	+	+
Vero C-76	-	-	+
Vero C-76	-	-	+
Vero C-76	-	-	-
Vero C-76	-	-	-
Hep-2	+	+	+
Hep-2	+	+	+
Hep-2	-	-	-
MRC-5	+	+	+
MRC-5	+	+	+
L929	-	-	+
3T3L1	+	+	+
BHK-21	+	+	+
RK-13	-	-	-

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

cultivos líquidos y sólidos. Es importante mencionar que cuatro muestras que fueron negativas en el estudio microbiológico resultaron positivas en la prueba de PCR (*Cuadro I*).

DISCUSIÓN

Cuando se busca aislar micoplasmas a partir de muestras clínicas o cultivos celulares contaminados por estos microorganismos, frecuentemente se observa que en el medio líquido o sólido no es posible evidenciar su presencia, a lo anterior se denomina muestra no cultivable, tal es el caso que registramos en los resultados presentados. No obstante, al someter el total de las muestras, es decir las que no mostraron evidencia de la presencia de micoplasmas por medio del estudio microbiológico, a la detección por medio de la técnica de PCR, se obtuvo que el total de las muestras dieron positivo a contaminación por micoplasmas. Cuando se presenta crecimiento en agar, generalmente revela niveles altos de contaminación por micoplasmas. Y la “ausencia” de crecimiento en agar es indicativo de niveles bajos de contaminación (< 100 micoplasmas por mililitro).¹⁰

Kuppelveld y colaboradores (1994) reportan 53% de aislamiento a partir del cultivo microbiológico y 56% de las muestras positivas con el análisis

por PCR. En el trabajo que aquí se presenta se obtuvo un 80% para el cultivo microbiológico y 100% para el análisis por PCR; este mayor porcentaje se atribuye a que las muestras incluidas en el presente trabajo contaban con un número considerable de pasos, es decir, que la fuente de contaminación se presenta al momento en que se trabaja con los cultivos celulares de forma rutinaria por parte del operador.¹⁴⁻¹⁶ Lo anterior se confirmó, ya que se incluyeron en el análisis suplementos que se utilizan para la propagación de los cultivos celulares, resultando negativos para la presencia de micoplasmas.

Debido a que se han reconocido rutinariamente cuatro especies de micoplasmas y una de *Acholeplasma* que causan el 98% de contaminación en los cultivos celulares (*Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans* y *Acholeplasma laidlawii*), se recomienda considerar un control óptimo al momento de manipular los cultivos celulares, ya que los micoplasma detectados son de origen humano, tanto en reportes previos como en el presente trabajo.

CONCLUSIÓN

Hoy en día los investigadores de las ciencias biomédicas presentan más atención a la contaminación de los cultivos celulares por microorganismos o por contaminación cruzada con células, siendo difícil detectarse, ya que la morfología y el comportamiento de las células en cultivo puede no cambiar. De tal forma, en años recientes, la técnica de PCR se ha convertido en una herramienta utilizada en laboratorios de investigación. Se sugiere que esta técnica se implemente para reforzar los programas de control de calidad en los laboratorios de diagnóstico biomédico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barile MF. Mycoplasma-tissue cell culture interactions. In: Tully JG, Whitcomb RF (ed). *The mycoplasmas*. New York: Academic Press, 1979; 425-474.
2. McGarrity GJ, Kotani H. Cell culture mycoplasmas. In: Razin S, Barile MF (ed). *The mycoplasmas*. New York: Academic Press, 1985; 353-390.
3. Stanbridge EJ. Mycoplasmas and cell cultures. *Bacteriol Rev* 1971; 35: 206-227.
4. Rivera-Tapia JA, Cedillo RL, Gil JC. Some biological features of Mollicutes. *Rev Latinoam Microbiol* 2002; 44: 53-57.
5. Del Giudice RA, Gardella RS, Hopps HE. Cultivation of formerly noncultivable strains of *Mycoplasma hyorhinis*. *Curr Microbiol* 1980; 4: 75-80.
6. Hopps HE, Meyer BC, Barile MF, Del Giudice RA. Problems concerning "non-cultivable" mycoplasma contaminants in tissue cultures. *Ann NY Acad Sci* 1973; 225: 265-276.
7. Gobel UB, Stanbridge E. Cloned mycoplasma ribosomal RNA genes for the detection of mycoplasma contamination of tissue cultures. *Science* 1984; 226: 1211-1213.
8. Johansson KE, Johansson I, Gobel UB. Evaluation of different hybridization in cell cultures. *Mol Cell Probes* 1990; 4: 33-42.
9. Razin S, Gross M, Wormser M, Pollack Y, Glaser G. Detection of mycoplasmas infecting cell cultures by DNA hybridization. *In Vitro* 1984; 20: 404-408.
10. Kuppeveld FJM, Johansson KE, Galama JMD, Kissing J, Bolske G, Van Der Logt JTM, Melchers WJG. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 149-152.
11. Spaepen M, Angulo AF, Marynen P, Cassiman JJ. Detection of bacterial and mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 99: 89-94.
12. Bolske G. Survey of mycoplasma infection in cell cultures and a comparison of detection methods. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol* 1988; Hyg A269: 331-340.
13. Shidu K, Rashidbaigi A, Testa D, Liao MJ. Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 128: 207-212.
14. Hay RJ. Operator induced contamination in cell culture systems. *Dev Biol Stand* 1991; 75: 193-204.
15. Lincoln CK, Gabridge MG. Cell culture contamination: Source, consequences, prevention and elimination. *Methods Cells Biol* 1998; 57: 49-65.
16. McGarrity GJ. Detection of mycoplasmas infection in cell cultures. *Adv Cell Cult* 1982; 2: 99-131.