

Rivera Tapia José Antonio\*,  
Castillo Viveros Linda Valeria\*\*,  
Sánchez Hernández José Antonio\*\*\*.

## Detección de micoplasmas en cultivos celulares

Mycoplasma detection in cell cultures

Fecha de aceptación: enero 2011

### Resumen

**introducción.** Los cultivos celulares se utilizan frecuentemente en la investigación biomédica, en el área industrial y para pruebas diagnósticas en hospitales. La contaminación de los cultivos celulares por microorganismos, o por contaminación cruzada entre cultivos es uno de los principales problemas en la investigación.

**objetivo.** Detección de micoplasmas en cultivos celulares provenientes de diferentes laboratorios biomédicos.

**material y métodos.** Los cultivos celulares se evaluaron para detectar presencia de micoplasmas por medio de cultivo microbiológico y PCR. Los cultivos celulares fueron crecidos en ausencia de antibióticos durante 3-4 días. La identificación se presentó por el cambio en el indicador de pH y ausencia de turbidez en el caldo y por la presencia en agar de las colonias características a través de microscopía estereoscópica. La comparación de los resultados obtenidos entre el método microbiológico y PCR se realizó con la prueba de T de Student.

**resultados.** Por el método microbiológico se detectó, en 9/20 muestras (45%), presencia de micoplasmas en los cultivos celulares y, por medio de la prueba de PCR, resultaron positivas 10/20 muestras (50%) de cultivos celulares. El análisis estadístico mostró que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en la detección entre el método microbiológico y PCR.

**conclusiones.** Es recomendable que la detección de micoplasmas en cultivos celulares se refuerce con otra técnica para validar los resultados.

**Palabras clave:** cultivos celulares, contaminación, micoplasmas, detección.

### Abstract

**introduction.** Cell cultures are widely used in both biomedical and biotechnological research centers and industry, as well as for diagnostic tests in hospitals. Contamination of cell cultures with microbial organisms as well as with virus or other eukaryotic cell lines are a major problem in cell culture related research.

**objective.** Mycoplasmas detection in cell cultures came from biomedical laboratories.

**material and methods.** The cell cultures screened for mycoplasmas by using microbiological culture and PCR. Cell cultures were grown in the absence of antibiotics for 3-4 days. Detection of mycoplasmas was based on alterations in the pH of the broth in the absence of turbidity, production of colonies with the aspect of fried eggs. Comparison between microbiological and PCR were made using Student T test.

**results.** Mycoplasmas were detected by culture in 9/20 (45%) of the cell culture samples and PCR revealed the presence of target DNA in 10/20 (50%) samples. Mycoplasmas detection between the microbiological culture and PCR show no significant differences ( $P > 0.05$ ).

**conclusion.** Mycoplasmas detection in cell cultures must be strengthened with another technique to validate the results.

**Keywords:** Cell cultures, contamination, mycoplasmas, detection.

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

\*\* Escuela de Biología de la BUAP.

\*\*\* Laboratorio de Biología Celular, Facultad de Medicina de la BUAP.

Correspondencia: José Antonio Rivera Tapia.

Laboratorio de Micoplasmas, Centro de Investigaciones Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP. Edificio 103-J, Ciudad Universitaria. Puebla, México, CP 72570.

Dirección electrónica: jart70@yahoo.com

## Introducción

Los micoplasmas son los microorganismos más pequeños y autorreplicables. Se caracterizan por presentar un genoma reducido en comparación con otros procariontes, y también carecen de pared celular, lo cual condiciona que presenten formas pleomórficas. Su distribución es considerable, ya que los podemos encontrar tanto en el ser humano como en diversos animales, y se reporta que pueden interferir en la investigación biomédica al infectar animales de laboratorio o contaminando cultivos celulares.<sup>1-4</sup>

La contaminación en cultivos celulares por micoplasmas puede inducir efectos citogenéticos, disminución en las concentraciones de nutrientes, alteración de la morfología celular, modulación de la respuesta inmune e incluso interrupción del metabolismo celular.<sup>5,6</sup> Si la contaminación se vuelve persistente se dificulta la detección y el diagnóstico, siendo difícil eliminar la contaminación en los cultivos celulares. En estos casos, la concentración de micoplasmas puede llegar hasta  $10^7$  UFC/ml.<sup>7</sup>

La identificación de micoplasmas implica ciertas dificultades porque su metabolismo no produce turbidez en el medio. Estos microorganismos no se tiñen por la técnica de Gram y su crecimiento colonial en medio sólido, además de ser lento, requiere ser observado por medio del microscopio. Por lo tanto, para la detección de micoplasmas en cultivos celulares se recomienda implementar al menos dos pruebas, ya que se ha visto que se pueden generar resultados falsos positivos o falsos negativos. El objetivo del presente trabajo fue la detección de micoplasmas en cultivos celulares provenientes de diferentes laboratorios biomédicos empleando dos métodos diferentes.

## Material y métodos

Del periodo de octubre de 2008 a diciembre 2009 se determinó la presencia de micoplasmas en 20 muestras de cultivos celulares y en 20 muestras de medios utilizados para crecer los cultivos celulares. El total de muestras se obtuvo de diferentes laboratorios biomédicos de la Ciudad de México.

La detección de micoplasmas se realizó por método microbiológico, con medios específicos para micoplasmas y con la técnica de PCR.

Los cultivos celulares fueron crecidos en ausencia de antibióticos durante 3-4 días. Enseguida se tomaron alícuotas de 1 ml. Cada alícuota se adicionó a 1 ml de caldo SP4 y se incubaron a 37° C durante 20 días. Cada tercer día se sembraron 5  $\mu$ l en agar SP4 y se incubaron en las mismas condiciones. La identificación se presentó por el cambio en el indicador de pH y ausencia de turbidez en el caldo, así como por la presencia en agar de las colonias características a través de microscopía estereoscópica. Los medios utilizados para crecer los cultivos celulares recibieron el mismo esquema de trabajo.

Para la detección por PCR se tomaron alícuotas de 1 ml de los cultivos y se realizó la extracción de ADN con ZR Fungal/Bacterial DNA kit™ (Zymo Research).

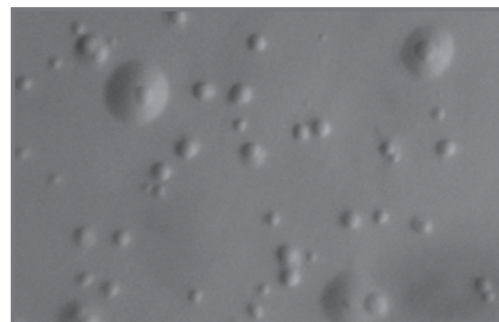
Los *primers* AR1 y AR2, que amplifican un fragmento de 301 pares de bases en 30 especies de micoplasmas, fueron utilizados en el presente trabajo. Para realizar la amplificación se utilizaron 10  $\mu$ l de PyroStart™ fast PCR Master Mix (2X), 1  $\mu$ l de cada uno de los primers, 5  $\mu$ l de ADN problema, y 3  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, para un volumen total de 20  $\mu$ l. A continuación se realizó la amplificación en un termociclador (Techne TC-412) con el siguiente esquema: 1 minuto a 95°C, 40 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C, finalmente 1 minuto a 72°C. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio. Los productos se visualizaron en un analizador de imágenes. Los medios utilizados para crecer los cultivos celulares recibieron el mismo esquema de trabajo. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC *Mycoplasma fermentans* PG-18. La comparación de los resultados obtenidos entre el método microbiológico y PCR se realizó con la prueba de T de Student.

## Resultados

Para detectar la presencia de micoplasmas fueron analizadas un total de 20 muestras de diferentes cultivos celulares y 20 muestras de medios utilizados frecuentemente para crecer los cultivos celulares. Por el método microbiológico se detectó presencia de micoplasmas en 9/20 muestras (45%) en los cultivos celulares, y en los medios utilizados para crecer los cultivos celulares solamente se detectó en 2/20 muestras (10%). El cultivo y la detección de micoplasmas se hicieron a través de medios específicos para estos microorganismos. En una primera etapa en fase líquida, y en una segunda etapa en fase sólida. En esta última, presentando la morfología característica (fotografía 1). Al realizar la detección por medio de la prueba de PCR resultaron positivas 10/20 muestras (50%) de cultivos celulares, y 2/20 muestras (2%) de los medios utilizados para crecer los cultivos celulares (cuadro 1). El análisis estadístico mostró que no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en la detección entre los métodos microbiológico y PCR.

Fotografía 1

Se presentan colonias en forma de “huevo frito” características de los micoplasmas. Las muestras corresponde a aislamientos a partir de cultivo celular Vero, (40X).



**Cuadro 1**  
**Aislamientos de micoplasmas**  
**por método microbiológico y PCR**

Cultivo celular	Detección microbiológica		PCR	
	+	-	+	-
L929 (3)	3	0	3	0
Wien (2)	1	1	1	1
SiHa (2)	0	2	1	1
Wil2S (2)	0	2	0	2
Vero (4)	4	0	4	0
BT474 (2)	1	1	0	2
HeLa (1)	0	1	1	0
Jukart (1)	0	1	0	1
A431 (1)	0	1	0	1
Raw (1)	0	1	0	1
Caski (1)	0	1	0	1
Total (20)	9	11	10	10

## Discusión

Incluir los medios utilizados para crecer los cultivos celulares permite descartar la contaminación por éstos y no por un mal manejo por parte del operador. Sin embargo, se observó que 2% de las muestras de los medios utilizados estaban contaminados por micoplasmas.

Con respecto a los cultivos celulares, presentaron 45% y 50% del total contaminados por medio de los métodos microbiológico y PCR, respectivamente. Reportes de los últimos cuatro años muestran entre 61.2% y 88.7% de contaminación por micoplasma en cultivos celulares.<sup>8,9</sup>

El cuadro 1 refleja que el cultivo celular SiHa y HeLa son negativos a presencia de micoplasmas por el método microbiológico. No obstante, por la técnica de PCR se validó una muestra en ambos cultivos celulares. En cambio, en los cultivos celulares BT474, que mostró 1 de 2 muestras positivas a micoplasmas por el método microbiológico, ambas muestras resultaron negativas con la técnica de PCR. Lo anterior puede estar en relación con la cantidad de muestra que no fue suficiente para evidenciar la presencia de micoplasmas por esta técnica, ya que se ha reportado discrepancia en los resultados, interpretándose como falsos negativos o falsos positivos con base en la comparación de distintos métodos de detección. Se ha reportado que la detección de micoplasmas por el método microbiológico, la técnica de hibridación de ADN, y por PCR son susceptibles a producir resultados falsos negativos o falsos positivos. Por lo tanto, sugerimos que se implementen al menos dos técnicas para validar los resultados durante la búsqueda de contaminación por micoplasmas en cultivos celulares.<sup>10-14</sup>

## Bibliografía

1. Rivera-Tapia JA, Cedillo-Ramírez ML, Gil-Juárez C. "Some biological features of mollicutes". *Rev Latinoam Microbiol* 2002; 44: 53-57.
2. Mayo CDM, Barrios BV, Ruiz AR, Cedillo RL, Rivera TJA. "Aislamiento de mollicutes en faringe y tracto urogenital". *Enf Inf Microbiol* 2009; 29: 6-10.
3. Baseman JB, Tully JG. "Mycoplasmas: sophisticated reemerging, and burdened by their notoriety". *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 21-32.
4. Nicolson GL, Gan R, Haier J. "Multiple co-infections (Mycoplasma, Chlamydia, human herpes virus-6) in blood of chronic fatigue syndrome patients: association with signs and symptoms". *APMIS* 2003; 111: 557-566.
5. Miyazaki K, Takaku H, Umeda M, Fujita T, Huang WD, Kimura T. "Potent growth inhibition of human tumor cells in culture by arginine deiminase purified from a culture medium of a mycoplasma-infected cell line". *Cancer Res* 1990; 50: 4522-4527.
6. Chambaud I, Wroblewski H, Blanchard A. "Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune system". *Trends Microbiol* 1999; 7: 493-499.
7. Garner CM, Hubbard LM, Chakraborti PR. "Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods". *Br J Biomed Sci* 2000; 57: 295-301.
8. Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifofo E. "Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR". *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 907-914.
9. Rivera A, Rivera E, Giono S, Gil C, Cedillo L. "Cell cultures contaminations by mycoplasmas". *Afr J Microbiol Res* 2009; 3: 637-640.
10. Van Kuppeveld FJM, Johansson KE, Galama JMD, Kissing J, Bolske G, et al. "Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR". *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 149-152.
11. Kong F, James G, Gordon S, Zelynski A, Gilbert GL. "Species-specific PCR for identification of common contaminant mollicutes in cell culture". *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 3195-3200.
12. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, et al. "PCR-based detection of mycoplasma species". *J Microbiol* 2006; 44: 42-49.
13. Schmitt M, Pawlita M. "High-throughput detection and multiplex identification of cell contaminations". *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 119-126.
14. Stömer M, Vollmer T, Henrich B, Kleesiek K, Dreier J. "Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminations and clinically important mollicute species". *Int J Med Microbiol* 2009; 299: 291-300.