

Desarrollo de PCR especie-específicos para la detección de micoplasmas contaminantes de cultivos celulares



Development of species-specific PCRs for the detection of mycoplasmas cell culture contaminants

<https://eqrcode.co/a/Vl6O3s>

Anisleidy Pérez Castillo, Arianna Duque Ortiz, Yaima Burgher Pulgarón,
Jose Antonio Agüero Fernández, Mario Sergio Solis Castells,  Evelyn Lobo-Rivero *

Laboratorio de Diagnóstico de Micoplasmas (MYCOLAB), Grupo de Bacteriología-Parasitología, Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32 700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: La contaminación por *Mollicutes* en los cultivos celulares es frecuente. Especies como *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma orale* y *Acholeplasma laidlawii* se identifican como causantes del 95 % de las contaminaciones. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar PCR especie-específicos para la identificación de las especies de micoplasmas contaminantes más frecuentes en cultivos celulares. Se optimizaron los parámetros críticos de la PCR y se determinaron la sensibilidad y especificidad analítica. Se estableció como valor óptimo de temperatura de hibridación 55°C; concentración de magnesio 1,5 mM y de cebadores se seleccionó un rango 0,3-0,5 μM. La sensibilidad analítica de la PCR fue de 1 pg/μL, mientras que su especificidad analítica fue 100 %. Se realizó la PCR especie-específico a 58 muestras de cultivo celulares donde previamente se detectó la presencia de *Mollicutes*. Como resultado se detectó *Mycoplasma orale* como la especie más frecuente, seguida de *Mycoplasma fermentans*, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma salivarium*. Los resultados de este estudio confirman que los ensayos PCR especie-específicos desarrollados son factibles de emplear para la identificación de especies de micoplasmas en cultivos celulares.

Palabras clave: cultivos celulares, diagnóstico, micoplasmas, PCR.

ABSTRACT: *Mollicute* contamination in cell cultures is common. Species such as *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma orale*, and *Acholeplasma laidlawii* are identified as causing 95 % of the contaminations. The present work is aimed at developing species-specific PCRs for the identification of the most frequent contaminating mycoplasma species in cell cultures. The critical parameters of PCR were optimized and the analytical sensitivity and specificity were determined. The optimum temperature for hybridization was set at 55°C; magnesium concentration at 1,5 mM. A range of 0,3-0,5 μM was selected for the primers. The analytical sensitivity of PCR was 1 pg/μL, while its analytical specificity was 100 %. Species-specific PCR was performed on 58 cell culture samples where the presence of *Mollicutes* was previously detected. As a result, *Mycoplasma orale* was detected as the most frequent species, followed by *Mycoplasma fermentans*, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma hyorhinis*, and *Mycoplasma salivarium*. The results of this study confirm that the species-specific PCR assays developed are feasible to use for the identification of mycoplasma species in cell cultures.

Key words: cell culture, diagnosis, mycoplasmas, PCR.

*Autor para la correspondencia: Evelyn Lobo-Rivero. E-mail: elobo@censa.edu.cu

Recibido: 03/01/2020

Aceptado: 14/05/2020

INTRODUCCIÓN

El cultivo celular juega un papel importante en la biotecnología moderna y en el desarrollo de numerosos proyectos de investigación (1). La contaminación de estos cultivos por hongos y bacterias es frecuente y tratable; sin embargo, se produce una contaminación grave y no fácilmente detectable por micoplasmas (2).

Estos microorganismos se aislaron por primera vez de un cultivo celular en 1956 por Robinson y Wichelhausen (3). Desde entonces y hasta la fecha, alrededor de 20 especies se describen como contaminantes en los cultivos celulares, donde *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hyorhinitis*, *Mycoplasma orale* y *Acholeplasma laidlawii* se identifican como causantes del 95 % de las contaminaciones (4). La incidencia de contaminación a nivel mundial de los cultivos celulares para una especie se encuentra entre 15 y 80 %; mientras que la coinfección puede encontrarse hasta en 60 % (5).

Se conoce que las especies *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hominis* se hallan comúnmente en el tracto orofaríngeo de los humanos, lo cual supone que el personal de laboratorio constituye una de las fuentes de contaminación de los cultivos celulares con micoplasmas (6). Por otra parte, *Mycoplasma arginini* y *Acholeplasma laidlawii* son frecuentemente identificadas en el suero bovino y *Mycoplasma hyorhinitis* es un patógeno frecuente de cerdos, de ahí que, tanto el suero bovino como el porcino que se utilizan para la elaboración de los medios de cultivo, pueden ser también una fuente posible de contaminación (7).

Otras fuentes de contaminación se relacionan con los animales de laboratorio (8), con embriones de pollos (9) y con los tejidos que se utilizan para la elaboración de cultivos primarios; de igual manera, las líneas celulares ya contaminadas pueden propagar la contaminación de micoplasmas (10).

Dada la importancia de la detección de las especies de micoplasmas más frecuentes en los cultivos celulares y la posibilidad de identificar la probable fuente de contaminación, el estudio tuvo como objetivo desarrollar ensayos PCR especie-específicos para la identificación de las especies más frecuentes de micoplasmas en cultivos celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de micoplasma

Se emplearon cepas de referencia pertenecientes a la Colección de Cultivos tipo Americana (ATCC, de sus siglas en inglés *American Type Culture Collection*) de *Mycoplasma orale* (ATCC15544), *Mycoplasma fermentans* (ATCC 19989), *Mycoplasma salivarium* (ATCC 23064) y de la Colección Nacional de Cultivos tipo Inglaterra (NCTC del inglés *National Collection Type Culture*) *Mycoplasma arginini* (NCTC 10129), *Mycoplasma hyorhinitis* (NCTC 10130) y de la Farmacopea Europea (Ph. Eur., de sus siglas en inglés *European Pharmacopoeia*) *Acholeplasma laidlawii*, pertenecientes todas a la colección de cepas del laboratorio MYCOLAB, CENSA, Cuba.

Siembra de las cepas

El cultivo de las cepas se realizó según lo descrito por Poveda (10). Se incubó durante 15 días en condición demicroarofilia y se realizaron lecturas cada 48 horas en el microscopio óptico marca Epson.

Extracción de ADN

De cada cultivo positivo a micoplasmas se tomó 1mL y se transfirió estérilmente a un tubo (Eppendorf de 1,5mL; se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min; el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 1mL de tampón fosfato salino (PBS) estéril y se homogenizó con agitación durante 2 minutos; luego, se repitió la centrifugación. Nuevamente el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 0,1 mL de agua destilada estéril. Se homogenizó durante 1 minuto y se colocó la suspensión en bloque térmico (Labnet, E.U.A.) a 100°C durante 10 minutos e inmediatamente se colocó en un recipiente con hielo. Cada vial se conservó a -20°C hasta posterior utilización, según lo descrito por Hernández *et al.* (11). La calidad y concentración del ADN se determinaron en el equipo ThermoScientific Nanodrop 2000 Spectrophotometer.

Cebadores

Los cebadores utilizados ([Tabla 1](#)) amplifican una región correspondiente al ARNr 16S de cada una de las especies de micoplasmas a diagnosticar mediante los ensayos de PCR especie-específicos.

Realización de la PCR

Para lograr la identificación de las especies de micoplasmas más frecuentes se realizó la amplificación a partir del ADN extraído del cultivo de cada una de las cepas descritas con anterioridad. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, que contenía 1X solución tampón II (Promega), 200 µM de cada dNTPs (Promega); 15 pmoles de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂ (Promega), 1 U de *Taq* polimerasa (Promega) y 3 µL de muestra de ADN de cepa de referencia. Se empleó agua libre de nucleasas como control negativo de la reacción. La reacción de PCR se desarrolló en un Termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) con el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo de a 94°C por 3 minutos, 32 ciclos de 94°C por 60 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, seguidos de un ciclo de 72 por 5 minutos. La corrida se realizó

en gel de agarosa (Sigma) al 1 % con TBE 0,5X, en cámara de electroforesis 2012 Maxiphor (LKB Bromma) con fuente (ShandonSouthern), a 100 Volts y 50 mA, durante 30 minutos. Los geles se tiñeron n bromuro de etidio con 0,5 µg/mL y los resultados se visualizaron en un transluminador de luz ultravioleta MacroVue (Pharmacia). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

Optimización de los parámetros críticos

La temperatura de hibridación del ensayo se evaluó entre el rango de 50°C a 60°C y se mantuvieron constantes el resto de los parámetros de la reacción.

Para la determinación de la concentración óptima de MgCl₂ se realizó una curva partiendo desde 0,5 mM hasta 4,5 mM, con incrementos de 0,5 mM ([13,14](#)). Para determinar este parámetro se trabajó con la temperatura de hibridación obtenida anteriormente. En la determinación de la concentración óptima de cebadores se emplearon concentraciones desde 0,1 uM hasta 0,6 uM, con incrementos de 0,1 uM, según lo descrito por Bolivar *et al.* ([15](#)). La PCR se realizó con la temperatura de unión y concentración de MgCl₂ óptimas seleccionadas previamente.

Tabla 1. Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizada para la amplificación del ADN de micoplasmas./ *Nucleotide sequence of primers used for mycoplasma DNA amplification.*

Especie	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Talla del fragmento (pb)	Referencia
<i>M. arginini</i>	S: TGA TCA TTA GTC GCT GGA GAG TC AS: TAT CTC TAG AGT GCT CGA CA TGA CTC	326	Kazemiha <i>et al.</i> (12).
<i>M. orale</i>	S: TGA TCA TTA GTC GGT GGA AAA CTA AS: TAT CTC TAG AGT CCT CGA CA TGA CTC	325	
<i>M. fermentans</i>	S: TGA TCA TTA GCT GAT GGG GAA CT AS: TCT CTT AGA GTC CTC AAC TAA ATG	324	
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	S GAT GAG AAC TAA GTG TTG GCC ATA A AS: CGC TAG AGT CCC CAA CTT AAT GA	300	
<i>M. salivarium</i>	S: ATGGATTGTAAAGTGCTGTTGCTAG AS: GCGTCAACAGTTCTCTGCCG	434	Timenetsky <i>et al.</i> (19).
<i>M. hyorhinis</i>	S: GTA GTC AAG CAA GAG GAT GT AS: GCT GGA GTT ATT ATA CCA GGA	346	Assunção <i>et al.</i> (18).

Leyenda: S: sentido; AS: antisentido

Determinación de la sensibilidad y la especificidad analítica

Se realizaron diluciones seriadas del ADN de cada una de las cepas (10 ng/μL- 1fg/μL), según lo recomienda Santos *et al.* (16). En el caso de la especificidad, el ensayo se realizó según lo recomienda la Farmacopea Europea (17) para la evaluación de la especificidad en los ensayos de PCR para la detección de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares.

Evaluación del ensayo en muestras

Se estudiaron 58 cultivos celulares positivos a *Mollicutes*, según lo reportado por Lobo *et al.* (18).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios de factibilidad se consideran como una etapa preliminar antes de la optimización (19). Esta fase nos indica si podemos o no continuar con el proceso de estandarización, lo cual depende de la correcta elección de los cebadores y del ADN blanco, parámetros críticos a tener en cuenta para el desarrollo de un sistema de PCR (20).

En la Figura 1 se puede observar la amplificación del ADN diana para cada una de las especies estudiadas, según lo descrito por Kazemiha *et al.* (12).

El sistema de PCR es reproducible en estas condiciones, pues se observa la amplificación de los ADN diana de las cepas utilizadas y los amplicones de cada una de ellas se corresponde con lo descrito por Kazemiha *et al.* (12) y Timenetsky *et al.* (21). La temperatura de alineamiento (Ta) es un parámetro crítico que necesita optimizarse en el PCR. Generalmente, la Ta adecuada comprende un rango de ±5°C del cebador con la menor temperatura de fusión (22). Como resultado de este trabajo se evidencia, en todas las especies estudiadas, amplificaciones con Ta de 60°C y 60,5°C, aunque se observan pequeñas diferencias en la intensidad de las bandas amplificadas con respecto al resto de las temperaturas empleadas (Fig. 1). Estos resultados pueden estar dados porque las Ta muy elevadas tienden a disminuir la sensibilidad del método, pues los cebadores se unirán a la banda

específica, pero con una fuerza y probabilidad de unión muy pequeñas. Por otra parte, la obtención de bandas de menor intensidad en las Ta cercana a 50°C, para la mayoría de las especies trabajadas, puede estar dado porque a temperaturas bajas de alineamiento se obtienen productos inespecíficos (23).

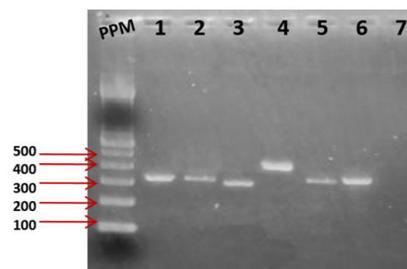


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos amplificados por PCR. PPM: Patrón de peso molecular de 100 pb (Promega); Línea 1: *M. hyorhinis* (346 pb); Línea 2: *M. fermentans* (324 pb); Línea 3: *A. laidlawii* (300 pb); Línea 4: *M. salivarium* (434 pb); Línea 5: *M. orale* (325 pb); Línea 6: *M. arginini* (326 pb); Línea 7: control negativo de la reacción, agua libre de nucleasas. / *Agarose gel electrophoresis at 1 % of PCR-amplified products PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega); Line 1: M. hyorhinis (346 bp); Line 2: M. fermentans (324 bp); Line 3: A. laidlawii (300 bp); Line 4: M. salivarium (434 bp); Line 5: M. orale (325 bp); Line 6: M. arginini (326 bp); Line 7: negative reaction control, nuclease-free water.*

A partir de estos resultados, se seleccionó 55°C como la temperatura óptima de alineamiento para los PCR especie-específicos que se optimizan, lo cual coincide con Sung *et al.* (24), Guevara (25) y Espinosa (26), quienes recomiendan utilizar Ta entre 50°C y 58°C. No obstante, es importante señalar que la selección de la Ta está en correspondencia con la Tm de los cebadores que se utilizan en cada ensayo y siempre debe tenerse presente, en la selección de la misma, la no formación de dímeros o que no afecte la especificidad y la sensibilidad del mismo.

Debido a que los iones magnesio (Mg₂₊) actúan como cofactores de la *Taq* polimerasa, su concentración en la reacción puede modificar el rendimiento de la misma en el ensayo, pues en ausencia o en baja concentración de Mg₂₊ libre, se afecta la actividad de la enzima, mientras que

un exceso de dichos iones reduce su fidelidad y se promueven amplificaciones inespecíficas (27).

Los resultados, a partir de la amplificación con diferentes concentraciones de MgCl₂, se muestran en la Figura 3. Como se observa, no se obtuvo amplificación cuando se utilizó 0,5 mM de MgCl₂. La amplificación del ADN diana se evidenció a partir de 1 mM y las bandas más intensas se observaron para 1,5 mM y 2 mM de MgCl₂ en las especies *Mycoplasma arginini*, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hyorhinitis*.

Estos resultados coinciden con Hernández *et al.* (28) y lo que refiriere Promega Protocols (23) sobre la concentración adecuada de MgCl₂, la cual usualmente se encuentra entre 1,5 mM a 3,0 mM. Como se menciona anteriormente, este es un factor crucial, pues puede afectar el funcionamiento del ensayo de PCR (27). Se seleccionó el valor de 1,5 mM como concentración óptima de MgCl₂, donde se observó una banda intensa de amplificación para todas las especies. El empleo de esta concentración (1,5 mM) como óptima coincide con lo descrito por Sung *et al.* (24), quienes señalan que es importante emplear la mínima concentración requerida para que el sistema funcione, ya que un exceso de MgCl₂ reduce la fidelidad de la enzima y puede incrementar las uniones inespecíficas, tal y como se expresó anteriormente.

De igual manera, la concentración de los cebadores constituye otro de los puntos críticos a evaluar cuando se optimiza un ensayo de PCR. A partir de la evaluación de este parámetro, en un rango de concentraciones desde 0,1 μM hasta 0,6 μM, se seleccionó el valor de concentración óptima para cada uno de los cebadores. Esto permitió la visualización, de forma consistente, de la amplificación de una banda de intensidad para cada una de las especies.

En el caso de *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hyorhinitis* y *Mycoplasma fermentans*, se seleccionó la concentración óptima de cebadores de 0,3 μM; para *Acholeplasma laidlawii* y *Mycoplasma salivarium* se seleccionaron las concentraciones óptimas de 0,4 μM y 0,5 μM, respectivamente.

Estos resultados coinciden con Bolívar *et al.* (15), pues refieren que la concentración de cebadores a emplearse en un ensayo de PCR oscila, generalmente, en el intervalo de 0,1 μM-0,5 μM. Sin embargo, no coinciden con Pérez (27) y Burgher (19), quienes señalan la concentración óptima de cebadores de 1,0 μM y 0,4 μM, respectivamente. La selección de la concentración de cebadores, para cada ensayo de PCR, se relacionó con la mínima concentración requerida para que el ensayo funcione y sea capaz de detectar cada diana en estudio, ya que se conoce que un exceso de cebadores puede favorecer la aparición de productos inespecíficos, tal y como lo señala Hernández (23).

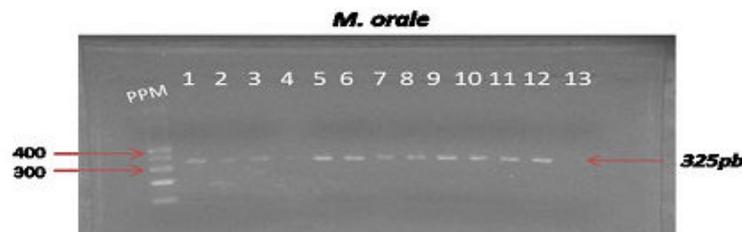


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Determinación de la temperatura de hibridación óptima para cada especie. PPM: Patrón de peso molecular de 100 pb (Promega); Línea 1-12: temperaturas (50°C; 50,2°C; 50,7°C; 51,6°C; 52,8°C; 54,1°C; 55,4°C; 56,9°C; 57,1°C; 59,2°C; 60°C; 60,5°C), Línea 13: control negativo de la reacción, agua libre de nucleasas. / *Agarose gel electrophoresis at 1 %. Determination of the optimal hybridization temperature for each species. PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega); Line 1-12: temperatures (50°C; 50.2°C; 50.7°C; 51.6°C; 52.8°C; 54.1°C; 55.4°C; 56.9°C; 57.1°C; 59.2°C; 60°C; 60.5°C), Line 13: negative reaction control, nuclease-free water.*

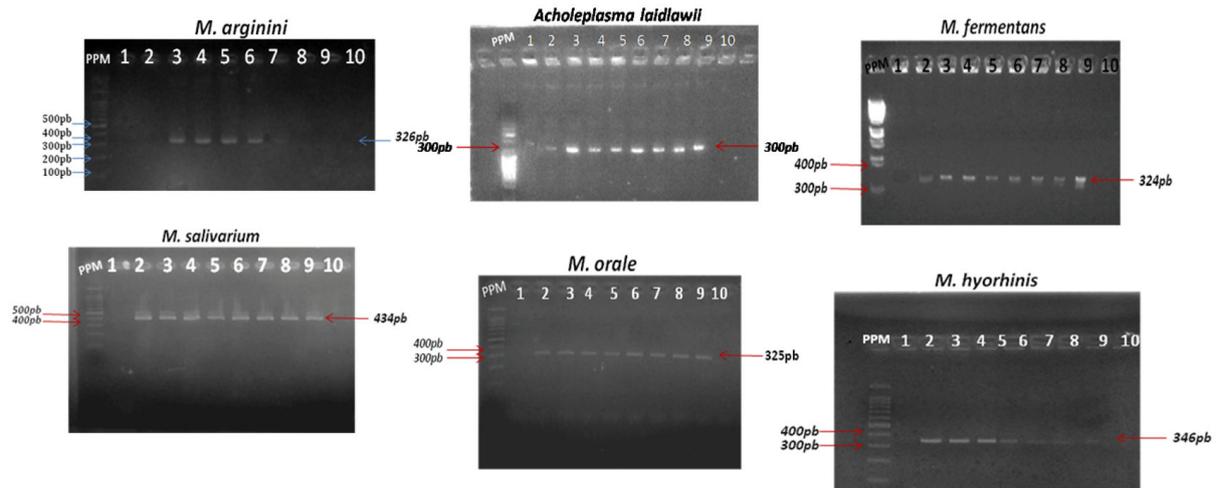


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Determinación de la concentración óptima de $MgCl_2$. PPM: Patrón de peso molecular de 100 pb (Promega); Línea 1-9: concentraciones de $MgCl_2$ (0,5 mM 1 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 2,5 mM; 3,0 mM; 3,5 mM; 4,0 mM; 4,5 mM). Línea 10: control negativo de la reacción, agua libre de nucleasas, amplificación con 1.5 mM de $MgCl_2$. / *Agarose gel electrophoresis at 1 %. Determination of the optimum $MgCl_2$ concentration. PPM: 100 bp molecular weight marker (Promega); Line 1-9: $MgCl_2$ concentrations (0.5 mM 1 mM; 1.5 mM ; 2.0 mM; 2.5 mM; 3.0 mM; 3.5 mM; 4.0 mM; 4.5 mM), Line 10: negative reaction control, nuclease-free water, amplification with 1.5 mM of $MgCl_2$.*

Tanto la especificidad como el límite de detección o la sensibilidad analítica son parámetros determinantes cuando se optimiza o valida un ensayo analítico (29). Este último parámetro es una de las mayores ventajas del PCR, lo que justifica su empleo en innumerables investigaciones (30). Se conoce el límite de detección como la mínima cantidad que es capaz de detectar el ensayo y puede representarse como número de copias del genoma, dosis infecciosa y unidades formadoras de colonias (UFC) del agente que se detecta (29).

Los resultados del límite de detección de los ensayos de PCR desarrollados, con el empleo del ADN de *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma fermentans*, *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma salivarium* y *Mycoplasma arginini*, demostraron que el ensayo fue capaz de detectar 1,1 pg/uL. Estos resultados coinciden con lo reportado por Lozada (30), quien logró un límite de detección similar 4,8 pg/uL en el estudio de validación de PCR para *Mollicutes* (29).

Es importante señalar que el límite de detección de un ensayo de PCR es variable y puede ser indicativo de la eficacia del método, ya que depende de factores como la temperatura de

alineamiento, el número de ciclos, la enzima a utilizar, los métodos de extracción, la cantidad de ADN molde, entre otros (31). Todos estos factores se tuvieron en cuenta durante la optimización de los ensayos y los resultados muestran que poseen una elevada sensibilidad, aspecto muy importante cuando se desea emplear para el diagnóstico de micoplasmas.

Por otra parte, la especificidad analítica es la habilidad de un ensayo de distinguir o detectar el blanco específico de otros agentes infecciosos. Se determina con el empleo de patógenos genéticamente similares que se encuentran comúnmente como contaminantes de las muestras clínicas del agente a detectar, para el cual fue diseñado el ensayo (17,29,32). La Tabla 2 muestra el resumen de los parámetros óptimos obtenidos durante la optimización de los ensayos de PCR especie-específicos.

Los ensayos optimizados resultaron ser específicos para la amplificación del ADN de las especies estudiadas, ya que no ocurrió amplificación cuando se realizó el PCR utilizando el ADN de las diferentes especies de micoplasmas y el ADN de bacterianas relacionadas filogenéticamente con los micoplasmas (17).

Tabla 2. Resumen de los parámetros óptimos obtenidos durante la optimización de los ensayos de PCR especie-específicos. / *Summary of the optimal parameters obtained during the optimization of species-specific PCR assays.*

Parámetros	Ms	Mf	Mo	Mh	Al	Ma
Temperatura óptima de alineamiento	55 °C	55°C	55°C	55°C	55 °C	55 °C
Concentración óptima de MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM	1.5 mM	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
Concentración óptima de cebadores	0,5 µM	0,3 µM	0,3 µM	0,3 µM	0,4 µM	0,3 µM
Sensibilidad analítica	2,2 pg/µL	1,1 pg/µL	3,3 pg/µL	2,2 pg/µL	1,1 pg/µL	7,7 pg/µL
Especificidad analítica	Específicos	Específicos	Específicos	Específicos	Específicos	Específicos

Leyenda: **Ms:** *Mycoplasma salivarium*, **Mf:** *Mycoplasma fermentans*, **Mo:** *Mycoplasma orale*, **Mh:** *Mycoplasma ahyorhinitis*, **Al:** *Acholeplasma laidlawii* y **Ma:** *Mycoplasma arginini*.

A las 58 muestras de cultivos celulares, donde se detectó la presencia de *Mollicutes*, se les realizó los diferentes PCR para identificar las especies contaminantes. Los PCR que se utilizaron permitieron identificar especies de micoplasmas en 56/58 (96,5 %) de las muestras; resultado que coincide con lo descrito por Assunção *et al.* (20); Timenetsky *et al.* (21) y Kazemiha *et al.* (12), por lo que se amplificó la banda correspondiente a cada especie. Solo en el caso de dos cultivos celulares no fue posible identificar la especie de micoplasmas que se encuentra presente como contaminante. Este resultado coincide con lo que reporta Nikfarjam y Farzaneh (33), quienes señalan, en el 1,2 % de las muestras investigadas, la presencia de *Mollicutes* como contaminantes sin que pudieran identificar la especie. Una posible explicación a este resultado es la presencia, en estos cultivos celulares, de alguno de los siguientes *Mollicutes*: *Mycoplasma homini*, *Mycoplasma pirum*, *Mycoplasma bovis* o *Acholeplasma vituli*, agentes que provienen de diferentes fuentes de infección y que también se reconocen como potenciales contaminantes de los cultivos celulares (34).

Los cultivos celulares contaminados por micoplasmas representan un hábitat artificial para estos microorganismos. Estudios en varios países demuestran que entre 10 % a 80 % de los cultivos celulares pueden quedar infectados por estos agentes (12). La presencia de una especie o la coinfección con otros agentes, también se reporta como un proceso donde los porcentajes dependen de varios factores (5,20,34).

Realizado este trabajo se concluye que los ensayos PCR especie-específico desarrollados son factibles de emplear para la identificación de especies de micoplasmas a partir de cultivos celulares.

REFERENCIAS

1. Fader CM, Medero A, Furlán M, Colombo MI, editors. Observación de *Mycoplasma* spp. por microscopía electrónica, tratamiento, eliminación y confirmación por PCR anidada. 10th Inter-American Congress on Electron Microscopy (CIASEM 2009). 2009.
2. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(4):1094-1156.
3. Chernov VM, Chernova OA, Sanchez-Vega JT, Kolpakov AI, Ilinskaya ON. *Mycoplasma* Contamination of Cell Cultures: Vesicular Traffic in Bacteria and Control over Infectious Agents. *Acta Naturae.* 2014;6(3):41-51.
4. Rottem S, Kosower NS, Kornspan JD. Contamination of Tissue Cultures by *Mycoplasmas*. *Biomedical Tissue Culture.* 2012;3:35-58.
5. Uphoff CC, Drexler HG. Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics. *Methods Mol Biol.* 2011;731:105-114.
6. Niffarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of *Mycoplasma* contamination in cell culture. *Cell Journal.* 2012;13(4):203-212.
7. McGarrity GJ, Kotani H. *Cell Culture Mycoplasmas*. The *Mycoplasmas*. Academic Press, Inc, New York, NY. 1985;4:353-390.
8. Ferreira J, Yamaguti M, Marques L, Oliveira R, Neto R, Buzinhani M, et al. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in laboratory rats and technicians. *Zoonoses and public health.* 2008;55(5):229-234.
9. Selwyn A, Wilson D, Volokhov DV, Zhiping Y, Chizhikov V. Evaluation of *Mycoplasma*

- Inactivation during Production of Biologics: Egg-Based Viral Vaccines as a Model. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):2718-2728.
10. Poveda JB. Biochemical Characteristic in *Mycoplasma* identification. En: *Methods in Molecular Biology. Mycoplasma Protocols.* Miles RJ, Nicholas RA (Eds). Totowa, New Jersey, USA. Humana Press. Inc. 1998;104:69-79.
 11. Hernández Y, Lobo E, Martínez S, Zamora L. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. *Rev Salud Anim.* 2009;31(2):108-114.
 12. Kazemiha VM, Shokrgozar MA, Arabestani MR, Moghadam MS, Azari S, Maleki S, et al. PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology.* 2009;61(3):117-124.
 13. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. MgCl₂ concentration. Relationship between MgCl₂ and dNTP concentration. *BioTechniques.* 1997;23:504-511.
 14. Promega Technical Bulletin. PCR Core Systems. Instructions for use of products M7660 and M7665. (en línea). Promega; 2005. Disponible en: <http://www.promega.com/tbs/tb254/tb254.html>.
 15. Bolívar AM, Rojas A, García-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed.* 2014;3(1):25-33.
 16. Santos LM, Melshor M, Mettifogo E, Timenetsky J. Detection of Micoplasmas from Cell Culture by PCR and Culture. En: *Abstract Book of 14th International Congress of the International Organization of Mycoplasmology (IOM).* July 7-12, Viena, Austria. 2002.
 17. Farmacopea Europea 8.0. Methods of analysis. *Mycoplasmas.* Appendix 2.6.7. 2014.
 18. Lobo E, Pérez A, Duque A, Burgher Y, Miranda L, Timenetsky J. Prevalence of Mollicutes in Cell Cultures: experience in Cuba. *Rev Salud Anim.* 2016;38(2):100-104.
 19. Burgher Y. Desarrollo de un sistema de PCR con control interno para la detección de micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares y productos biológicos. (Tesis de Maestría). Mayabeque, Cuba, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). 2012.
 20. Assunção P, De la Fe C, Kokotovic B, Gonzalez O, Poveda JB. The occurrence of micoplasmas in the lungs of swine in Gran Canaria (Spain). *Vet Res Commun.* 2005;29(6):453-462.
 21. Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(7):907-914.
 22. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. Annealing time and temperature. *BioTechniques.* 1997;23:504-511.
 23. Promega Protocols and Applications Guide. Nucleic Acid Amplification. Chapter 1 (en línea). Promega; 2009. Disponible en: <http://www.promega.com/paguide/>.
 24. Sung H, Hye S, Jin Y, Tae J, Rok Y, Lee C, Song S. PCR Based Detection of Mycoplasmas Species. *J of Microbiol.* 2006;44(1):42-49.
 25. Guevara P. Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. En: *Manual de laboratorio. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio.* Red de Innovación Tecnológica. IDMM editores. Venezuela, 2004;1-102.
 26. Espinosa L. Guía práctica sobre la técnica de PCR. Eguiarte L., V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología molecular.* Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, México, 2007;517-526.
 27. Pérez LJ. Desarrollo y evaluación de un ensayo de RT-PCR múltiple para la detección simultánea y diferencial del virus de la peste porcina clásica y Pestivirus. (Tesis de Maestría). La Habana, Cuba: Universidad Agraria de la Habana. 2008.
 28. Hernández Y. Desarrollo de un ensayo de PCR para la detección de micoplasmas en cultivos celulares y productos biofarmacéuticos. (Tesis de Maestría). La

- Habana, Cuba: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). 2007.
29. OIE. Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. Capítulo 1.1.5. 2014.
30. Lozada Y. Detección confiable de micoplasmas en productos biofarmacéuticos de aplicación biomédica. (Tesis de Maestría). Mayabeque, Cuba: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). 2012.
31. Farmacopea Británica Veterinaria. Test for Absence of Mycoplasmas. Appendix XVI. B (Vet), 2004;3:A17- A19.
32. Estandarización de la PCR y generalidades (en línea). Monografías; 2008. Disponible en: <https://www.monografias.com/trabajos53/generalidades-pcr/generalidades-pcr.shtml>.
33. Niffarjam L, Farzaneh P. Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. Cell Journal. 2012;13(4):203-212.
34. Invivogen; 2005. Mycoplasma: The Insidious Invader of Cell Cultures (en línea). Disponible en: <http://www.invivogen.com/docs/Insight200511.pdf>

Contribución de los autores: Anisleidy Pérez Castillo: Ejecución de ensayos, análisis y discusión de resultados. Arianna Duque Ortiz: Ejecución de ensayos, análisis y discusión de resultados. Yaima Burgher Pulgarón: Ejecución de ensayos y discusión de resultados. José Antonio Agüero Fernández: Análisis y discusión de los resultados. Mario Sergio Solís Castells: Ejecución de ensayos. Evelyn Lobo-Rivero: Diseño de la investigación, análisis, discusión y escritura de resultados.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)