

TESIS DEFENDIDA EN OPCIÓN AL TÍTULO DE MÁSTER EN MICROBIOLOGÍA VETERINARIA

Desarrollo de un sistema de PCR con control interno para la detección confiable de micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares y productos biológicos

Development of a PCR system with internal control for the reliable detection of mycoplasmas contaminating cell cultures and biological products

Yaima Burgher Pulgarón

Lugar: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA)

Fecha: 31 marzo 2012

La contaminación de los cultivos celulares y productos biológicos con micoplasmas constituye un problema serio y extenso en el mundo, ya que trae como resultado ensayos experimentales poco confiables y productos biológicos poco seguros. Debido a esto, las agencias reguladoras han establecido, dentro de los parámetros de calidad de productos biológicos, la detección de micoplasmas como prueba determinante para la liberación o no de estos productos. En tal sentido se debe disponer de ensayos sensibles y confiables para la detección de estos contaminantes. El diagnóstico molecular basado en la amplificación de los ácidos nucleicos por PCR se ha visto limitado por la presencia de sustancias que pueden inhibir la amplificación del ADN. Teniendo en cuenta estos antecedentes se hace necesario incorporar al ensayo de PCR un sistema de amplificación con control interno que permita detectar posibles resultados falsos negativos originados por la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras que se analizan, cumpliendo de esta forma con lo establecido según las normas de la Organización de Estándares Internacionales (ISO), el Manual de la Organización Mundial de Sanidad Animal y la Farmacopea Europea del 2010. Por lo tanto, nos propusimos como objetivo del presente trabajo desarrollar un sistema de PCR con control interno para la detección confiable de micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares y productos biológicos de aplicación biomédica. Para esto se seleccionó un plásmido recombinante como control interno y se evaluó *in silico* e *in vitro* dicho plásmido, así como los cebadores para su amplificación. Posteriormente se optimizaron los parámetros críticos del ensayo y se determinó la especificidad y sensibilidad analíticas del mismo. Una vez desarrollado el ensayo de PCR con control interno, se procedió a evaluarlo en muestras previamente caracterizadas que forman parte de un panel de muestras de MYCOLAB. Como resultados de este trabajo se logró desarrollar un sistema de PCR con control interno específico que permite la detección confiable de micoplasmas y de posibles muestras inhibitorias sin disminuir la sensibilidad del ensayo. Se evidenció que el método desarrollado es factible de utilizar en muestras biológicas, siendo capaz de detectar posibles muestras inhibitorias. A partir de estos resultados se garantiza brindar un servicio más confiable que permita la liberación de los productos testados con la calidad requerida y de esta manera cumplir con las exigencias de los organismos reguladores internacionales.