

Detección de contaminación por *Mollicutes* en cultivos celulares mediante amplificación del gen 16S rARN

Detection of *Mollicutes* contamination in cell cultures by 16S rRNA amplification

► Gustavo Sobarzo Aguayo^{1*}, María Angélica Martínez Tagle^{2*}, Roberto Vidal Alvarez^{3*}, María Cristina Martínez Torrens^{4**}, Luis Fidel Avendaño Carvajal^{5***}

1. Médico veterinario.
2. Médico veterinario, MSc.
3. Ph.D.
4. Alumna 7° año Medicina.
5. Médico cirujano.

* Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Independencia 1027, Santiago, Chile.

** Interna 7° año Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

*** Programa de Virología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Independencia 1027, Santiago, Chile.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

Resumen

La contaminación de los cultivos celulares por *Mollicutes* es un hecho frecuente en los laboratorios, reportándose hasta un 80% de cultivos contaminados, lo que resulta en ensayos experimentales poco confiables y en productos biológicos poco seguros. Los objetivos del presente estudio fueron: estimar la frecuencia de micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares y analizar la eficiencia de un ensayo de PCR que emplea como ADN blanco al gen 16S rARN de los *Mollicutes*. Se estudiaron 39 cultivos celulares, representativos de las líneas celulares más utilizadas y 17 cultivos celulares primarios, recibidos para análisis de contaminación, entre julio y diciembre de 2005. Se detectaron micoplasmas en 18/39 (46,2%) cultivos de líneas celulares, mientras que no se detectaron micoplasmas en los cultivos celulares primarios. El análisis mediante *HpaII* del espacio intergénico 16S-23S rARN de 6 cultivos positivos determinó dos patrones de restricción. La secuenciación del ADN de dos amplicones identificó a *Mycoplasma hyorhinis* y a *Mycoplasma salivarium* como micoplasmas contaminantes. La sensibilidad analítica de la PCR, determinada a partir de diluciones de un cultivo de *Mycoplasma hominis* fue 0,01 u.c.c./mL (unidades cambiadoras de color por mL), mientras que su especificidad analítica fue 100%. Los resultados de este estudio confirman la importancia de los micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares y sugieren que la PCR dirigida al gen 16S rARN es un procedimiento útil para el diagnóstico de estos microorganismos.

Palabras clave: *Mollicutes* * contaminación * cultivos celulares

Summary

Up to 80% of cell cultures have been reported to be contaminated with *Mollicutes*, causing unreliable experimental results and giving rise to unsafe biological products. The aims of this study were to estimate the frequency of mycoplasmas as contaminants in cell cultures, and to analyze

the performance of a PCR assay targeting the 16S rRNA of Mollicutes. Thirty-nine cell cultures representing the most used lines of cell cultures and 17 primary cell cultures submitted for detection of mycoplasma contamination were studied between July and December 2005. Mycoplasmas were detected in 18/39 (46.2%) cell line cultures, and in none of the primary cell cultures. HpaII analysis of the 16S-23S rRNA intergenic space of 6 positive cultures belonging to different laboratories gave two different restriction patterns. The sequentiation of each of the two patterns identified *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma salivarium* as the contaminant mycoplasmas. The analytic sensitivity of the 16S rRNA PCR was 0.01 color-changing units per mL, as determined for dilutions of a *Mycoplasma hominis* culture, whereas the analytical specificity was 100%. In conclusion, these results reaffirm the importance of mycoplasmas as cell culture contaminants, and suggest that 16S rRNA PCR is a reliable method for detection of these organisms as cell culture contaminants.

Key words: Mollicutes * contamination * cell cultures

Introducción

Los *Mollicutes* (micoplasmas) son las bacterias más pequeñas capaces de crecer en medios de cultivo acelulares y las únicas que no poseen pared celular, por lo que son extremadamente frágiles (1). Tienen un marcado tropismo por las membranas citoplasmáticas de las células eucarióticas, de las cuales obtienen colesterol que incorporaran en su propia membrana celular para darle mayor estabilidad (1). Esta propiedad los hace ubicuos, habiendo sido aislados de cerca de 120 especies animales, insectos y vegetales (1).

Varias especies de micoplasmas han sido descritas como contaminantes habituales de los cultivos celulares (2-5), lo que constituye un grave problema ya que causan diversas alteraciones en el metabolismo celular y depletan a la célula huésped de nutrientes esenciales (4). La detección de micoplasmas en los cultivos celulares constituye actualmente un requerimiento indispensable para alcanzar los estándares de calidad de los laboratorios.

La mayoría de los micoplasmas contaminantes se caracterizan por su diagnóstico en cultivo lento y difícil (4). Como alternativas al cultivo se han empleado la tinción fluorescente del ADN, 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (Tinción de Hoechst o DAPI) y las técnicas inmunológicas, como la inmunofluorescencia directa (IFD) (2) (3). Estas técnicas son más rápidas y simples de efectuar, pero en el caso de la tinción DAPI su sensibilidad y especificidad es limitada y en la IFD requieren un panel de anticuerpos monoclonales difíciles de obtener (2) (3). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido empleada en los últimos años como una alternativa más sensible para la detección de estos microorganismos en cultivos celulares y sus insumos (5-8). Dada la gran cantidad de especies que es posible detectar como contaminantes, los partidores más utilizados están diseñados para reconocer el gen 16S rARN o el espaciador 16S-23S rARN (5-8). Los objetivos de es-

te estudio fueron estimar la frecuencia de aislamiento de micoplasmas como contaminantes en cultivos celulares y analizar la utilidad de una técnica de PCR para la detección de micoplasmas en los mismos.

Materiales y Métodos

CULTIVOS CELULARES

Se investigó la presencia de micoplasmas en 39 cultivos de 4 líneas celulares de origen epitelial: HeLa, Hep-2, MDCK y MA104 y en 17 cultivos primarios de origen nervioso. Sobrenadantes de los cultivos celulares fueron gentilmente donados por cinco laboratorios que utilizan de rutina esta tecnología, en la Región Metropolitana, Chile. Las muestras fueron inmediatamente congeladas a -20°C y procesadas dentro de las 72 h de recibidas.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se amplificó un fragmento de 715 pb del gen 16S rARN específico de la clase *Mollicutes*, empleando los cebadores GPO-1 y MGSO, descritos por Van Kuppelveld FJ y cols. (6). Para la extracción del ADN se procesó una alícuota de 250 μL del sobrenadante del cultivo celular, mediante el equipo comercial Wizard SV Genomic DNA (Madison, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen de 50 μL que contenían 2,5 U Taq ADN polimerasa (Promega), 200 μM de cada nucleótido trifosfato, 2,5 mM MgCl_2 y 1 μM de cada cebador. Los ciclos de amplificación consistieron en 1 min de denaturación a 94°C , seguido por 40 ciclos de 1 min de denaturación a 94°C , 1 min de hibridación a 60°C y 1 min de extensión a 72°C y un ciclo final de 7 min de extensión a 72°C . Las amplificaciones fueron

efectuadas en un termociclador MJ Research, Modelo Mini Cycler^{MR}, EE.UU. Como controles positivos del proceso de amplificación se incluyeron muestras clínicas positivas para *M. hominis*, *Ureaplasma* spp. o *M. pneumoniae*. Como control negativo de la reacción se incluyó un tubo que contenía todos los reactivos excepto ADN. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador de luz UV. Como patrón de peso molecular se utilizó ADN *ladder* de 100 pb.

Para el cálculo de la sensibilidad analítica de la PCR se sometieron a PCR diluciones decimales seriadas de un cultivo de la cepa ATCC 23214 de *M. hominis* de concentración conocida, determinando la mínima cantidad de ADN capaz de amplificar. Para confirmar el espectro de especies capaces de ser detectadas mediante la PCR, se amplificó el ADN de las siguientes especies: *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. Para verificar la especificidad analítica de la técnica de PCR se amplificó el ADN de los siguientes microorganismos: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* grupo *viridans*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*.

ANÁLISIS DE LA REGIÓN ESPACIADORA
16S-23S rARN MEDIANTE DIGESTIÓN
ENZIMÁTICA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se amplificó la región intergénica 16S-23S rARN de seis cultivos celulares positivos para micoplasmas con los sebadores 5'-TGC GGC TGG ATC ACC TCC TT-3' y 5'-GGC TGC TTC TAA GCC AAC-3', cuyas posiciones son los nucleótidos 1518-1541 y 1069-1052 de la región espaciadora 16-23S rARN de *E. coli*, respectivamente (9). Las amplificaciones fueron efectuadas en un volumen de 50 µL que contenía 2,5 U *Taq* ADN polimerasa, 200 µM de cada nucleótido trifosfato, 1,5 mM MgCl₂ y 1 µM de cada sebador. Los

ciclos de amplificación consistieron en 2 min de denaturación inicial a 92 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min de denaturación a 92 °C, 30 s de hibridación a 48 °C y 2 min de extensión a 72 °C y un ciclo final de 7 min de extensión a 72 °C. La longitud del fragmento amplificado correspondió a 700 pb. La longitud y secuencia de la región amplificada varía en distintas especies bacterianas (9).

Los productos de amplificación fueron luego digeridos con la enzima de restricción *HpaII* (New England Biolabs, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador de luz UV. Como patrón de peso molecular se utilizó ADN *ladder* de 100 pb.

SECUENCIACIÓN DEL ADN

Se secuenció el ADN de dos cultivos celulares contaminados y que presentaron un patrón de corte distinto por *HpaII*, en un secuenciador automático ABI 373 (Applied Biosystem, Ca., USA). Las especies de micoplasmas fueron identificadas por comparación de su secuencia nucleotídica 16S rARN con las secuencias depositadas en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mediante la herramienta de análisis BLAST.

Resultados

Se detectaron micoplasmas en 18/39 (46,2%) cultivos de líneas celulares y en ninguno de los cultivos primarios evaluados. En la Fig. 1 se muestran los resultados de la amplificación del ADN mediante PCR de algunos cultivos celulares positivos. Los productos de amplificación se caracterizaron por su gran intensidad y nitidez, no observándose bandas de amplificación inespecífica o degradación de ADN en ninguna oportunidad.

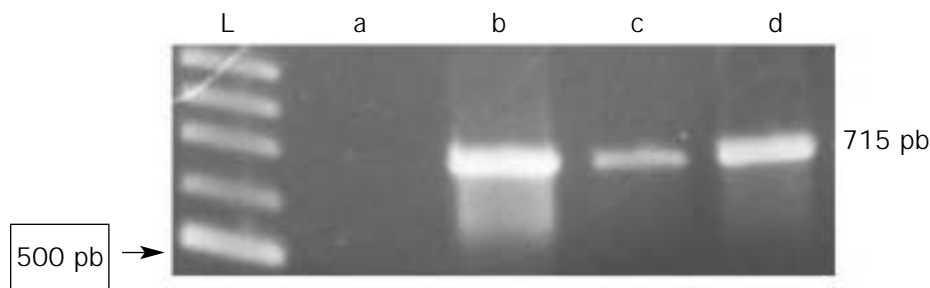


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante PCR de dos cultivos celulares. Canales: L, marcador de peso molecular de 100 pb; a, control negativo; b, control positivo; c y d, cultivos positivos.

La PCR permitió la amplificación del ADN de todas las especies de la clase *Mollicutes* evaluadas, pero no de los otros microorganismos incluidos. La sensibilidad analítica de la PCR correspondió a 0,01 unidades cambiadoras de color (u.c.c.) por mL, y resultó 100 veces más sensible que el aislamiento en cultivo. En la Fig. 2 se muestra la amplificación de 3 especies distintas de micoplasmas.

El corte enzimático con *HpaII* de los productos de amplificación de la región intergénica de 6 cultivos celulares positivos mostró dos patrones de restricción claramente distinguibles. Cada patrón perteneció a líneas celulares provenientes de dos laboratorios diferentes. Uno de los patrones de restricción correspondió en el análisis de la secuencia nucleotídica a *Mycoplasma salivarium* y el otro a *Mycoplasma hyorhinis* (Fig. 3).

Discusión

La presencia de micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares es un problema frecuente en los laboratorios que efectúan tales cultivos, estimándose que entre el 15-80% de los mismos están contaminados con estos microorganismos (2-5) (10). Con menor frecuencia se detectan micoplasmas en cultivos primarios de células. A diferencia de otras bacterias, los micoplasmas crecen lentamente y no producen cambios apreciables en los cultivos. Sin embargo, producen alteraciones en el metabolismo celular, lo que va en detrimento de los procesos de investigación, diagnóstico y producción (4). Se ha calculado que en un cultivo celular contaminado con micoplasmas existe una mayor cantidad de micoplasmas que de células eucarióticas (11). De esta forma, mientras en un frasco de cul-

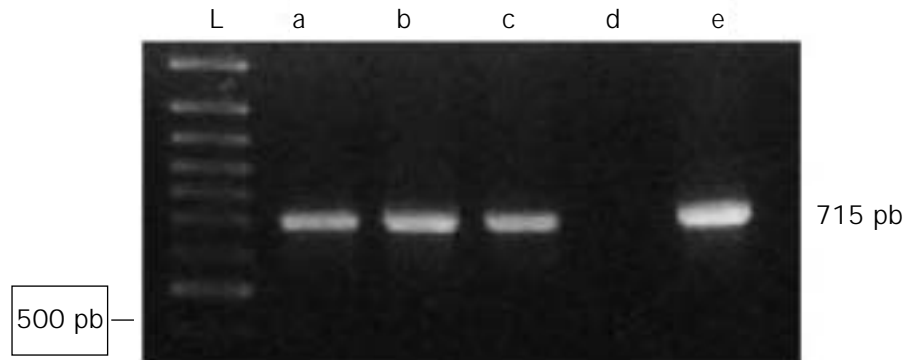


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante PCR de tres especies de micoplasmas. Canales: L, marcador de peso molecular de 100 pb; a, b y c, *M. orale*, *M. genitalium* y *Ureaplasma parvum* respectivamente; d, control negativo; e, control positivo.

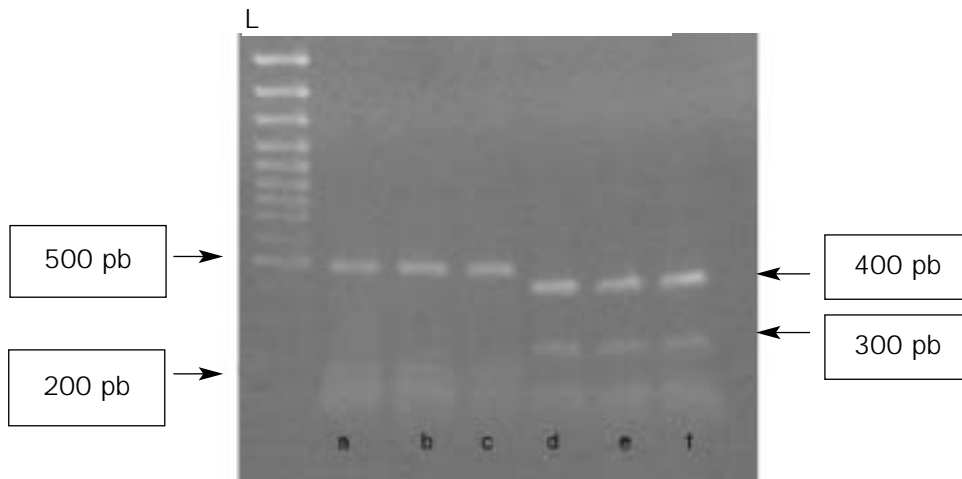


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra los patrones de corte con *HpaII* de 6 cultivos celulares positivos para *Mollicutes*. L: marcador peso molecular 100 pb a-c, y d-f, dos patrones de restricción diferentes.

tivo de 25 cm³ se detectan 10⁷-10⁸ micoplasmas por mL de sobrenadante, la monocapa confluyente contiene 1-5 x 10⁶ células eucarióticas (11).

Se han aislado alrededor de 17 especies de micoplasmas en cultivos celulares contaminados, pero 5 especies, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma fermentans* y *Acholeplasma laidlawii* constituyen el 95% de las especies identificadas (2-4) (11). De las especies anteriormente mencionadas, *M. orale* y *M. fermentans* forman parte de la microbiota comensal orofaríngea y genital humana, respectivamente, mientras que las otras especies tienen un origen animal (4) (11). En el presente estudio se detectó *M. hyorhinis*, de origen porcino y *M. salivarium*, una especie comensal de la cavidad orofaríngea humana.

Se han desarrollado escasos protocolos para la detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante PCR (5-8). La mayoría de ellos se basa en la amplificación del gen 16S rARN (5-7), mientras que Kong F y cols. implementan un ensayo que amplifica la región espaciadora 16 S-23S rARN (8). El procedimiento utilizado en este estudio fue diseñado para detectar micoplasmas en muestras clínicas humanas, demostrando ser muy sensible y específico para la detección de micoplasmas en cultivos celulares (6). También ha demostrado ser útil y sensible para la detección de micoplasmas en insumos de uso en cultivos celulares (7). En el presente estudio el límite de detección de la PCR fue 0,01 u.c.c., correspondiendo 1 u.c.c. a 10-100 microorganismos (12). No existe una medida única para informar la sensibilidad analítica de las PCR en los micoplasmas, lo que crea dificultades para comparar distintos protocolos (12). Cuando los laboratorios pueden cultivar las especies informan el límite de detección de los microorganismos en caldo (u.c.c) y si ello no es posible, se indica la mínima concentración de ADN que es capaz de amplificar el procedimiento. Con respecto a su especificidad, se ha demostrado 93% de especificidad en comparación con un estándar de referencia que incluyó cultivo e hibridación de los ácidos nucleicos (5). No obstante, Kong F y cols., mediante secuenciación del ADN, comprobaron como ADN de *Mollicutes* a 60/73 amplicones obtenidos por este procedimiento, correspondiendo las otras 13 secuencias a ADN de bacterias contaminantes grampositivas (8). Sería necesario conocer con certeza la especificidad de la técnica de PCR presentada, especialmente si se desea descontaminar los cultivos celulares positivos, ya que podrían existir diferencias en la sensibilidad antimicrobiana entre los micoplasmas y las bacterias grampositivas contaminantes.

La eficacia de la eliminación de los micoplasmas de los cultivos celulares contaminados varía entre 71-86%, según el esquema antimicrobiano que se emplee (13). No obstante, la eficacia global de la descontami-

nación, empleando más de un esquema si se produce una falla en la erradicación de los microorganismos frente a un tratamiento es 96% (13). Las fallas en erradicar los micoplasmas se deben a resistencia antimicrobiana (3-20%) o al efecto citotóxico del antimicrobiano empleado (3-11%) (13). Los antimicrobianos más empleados corresponden a las tetraciclinas, las quinolonas y los macrólidos, debiéndose recordar que la sensibilidad a los distintos macrólidos difiere entre las especies de *Mollicutes* (14).

En conclusión, este estudio sugiere que los micoplasmas son contaminantes frecuentes de los cultivos celulares en laboratorios de este país y que la técnica de PCR con amplificación del 16S rARN es un procedimiento útil para su detección.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento a través del Proyecto FONIS SAO 412084.

CORRESPONDENCIA

DRA. M. ANGÉLICA MARTÍNEZ TAGLE
Suecia 1524. Departamento 403
SANTIAGO. Chile
Tel.: 6786639-6296
E-mail: mamartin@med.uchile.cl

Referencias bibliográficas

1. Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 21-32.
2. Bolske G. Survey of *Mycoplasma* infections in cell cultures and a comparison of detection methods. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (A)* 1988; 269: 331-490.
3. Blazek R, Schmitt K, Krafft U, Hadding U. Fast and simple procedure for the detection of cell culture mycoplasmas using a single monoclonal antibody. *J Immunol Methods* 1990; 131: 203-12.
4. McGarrity GJ, Kotani H, Butler GH. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: Maniloff J, McElhane RN, Finch LR, Baseman JB, (eds): *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington: American Society of Microbiology; 1994. p. 445-54.
5. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 2002; 38: 79-85.
6. Van Kuppeveld FJ, Van der Logt JT, Angulo AF, Van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2606-15.

7. Dussurget O, Roulland-Dussoi D. Rapid, sensitive PCR-based detection of PCR detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 953-9.
8. Kong F, James G, Gordon S, Zelynski A, Gilbert G. Species-specific PCR for identification of common contaminant *Mollicutes* in cell culture. *Appl Environment Microbiol* 2001; 67: 3195-200.
9. Massol-Deya AA, Odelson DA, Hickey RF, Tiedje JM. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). En: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Antoon D L. Ackermans, Dordrecht (The Netherlands): Academic Publishers; 1995.
10. Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. *Biologicals* 2005; 33: 81-5.
11. Razin S. Mycoplasma taxonomy and ecology. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, Baseman JB, (eds): *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington: American Society of Microbiology; 1994. p. 3-22.
12. Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4915-23.
13. Uphoff CC, Meyer C, Drexler HG. Elimination of mycoplasmas from leukemia-lymphoma cell lines using antibiotics. *Leukemia* 2002; 16: 284-8.
14. Schmitt K, Daubener W, Bitter-Suermann D, Hadding U. A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. *J Immunol Methods* 1988; 109: 17-25.

Aceptado para su publicación el 27 de octubre de 2006

