

**Maestría en Microbiología Molecular
Universidad Nacional de General San Martín
ANLIS "CARLOS G. MALBRAN"**

Tesis:

**DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA
INFECCIÓN POR MICOPLASMAS EN LÍNEAS
CELULARES. INTENTO DE ELIMINACIÓN DE
LA INFECCIÓN CON TRATAMIENTO
ANTIBIÓTICO**

**Maestrando: Celeste Luján Pérez
Director: Dr. Jerónimo Cello**

2002

*A Telma Topa,
mí mamá*

Indice

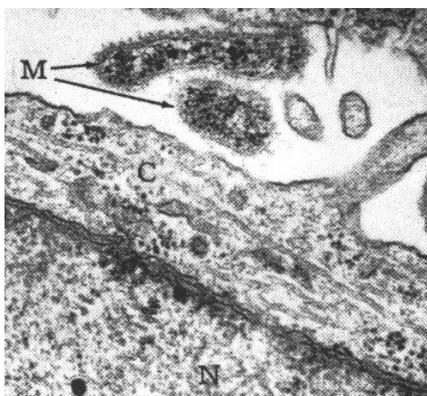
Tema	Página
INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante tinción de ADN y PCR.	13
Líneas celulares	13- 14
Medios de cultivo	14
Cepas patrones de micoplasmas	15
Detección por tinción de Hoechst	15
Detección de la infección por PCR	17
Tipificación de las cepas	20
Análisis de restricción enzimática (RFLP)	20
Enzimoimmunoensayo de captura (ELISA)	21
Estandarización de un método de eliminación de diferentes especies de micoplasmas que infectan cultivos celulares.	23
Determinación de la dosis máxima no citotóxica de ATB	24
Tratamiento de células infectadas con la DMNC	26
Efecto del tratamiento	27
Efecto sobre el crecimiento celular	27

Efecto sobre la sensibilidad celular a la infección viral	28
RESULTADOS	32
Sensibilidad de la PCR	32
Interferencia de DNA celular en la detección de micoplasmas	32
Detección de cultivos infectados por tinción de ADN y por PCR	33
Tipificación de las cepas encontradas por RFLP y ELISA	35
Tipificación con enzimas de Restricción	35
Tipificación por ELISA	37
Detección y tipificación por todas las técnicas empleadas	38
Estandarización de un método de eliminación de diferentes especies de micoplasmas que infectan cultivos celulares.	39
Ensayo de citotoxicidad	39
Tratamiento de células con infección leve	46
Efecto del tratamiento	48
Efecto del tratamiento sobre la tasa de crecimiento	48
Efecto sobre la sensibilidad celular a la infección viral	49
Análisis estadístico	50
DISCUSION	51
Abreviaturas	58
Bibliografía	60
Agradecimientos	66

Introducción

Los micoplasmas (M) son microorganismos cuyos tamaños varían entre 0.2 a 0.3 μm , cercano al tamaño de los poxvirus. Poseen el genoma procariota más pequeño, que en algunas especies llega a ser menor de 660 kb. A diferencia de la mayoría de las bacterias, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la síntesis de pared celular, la síntesis de purinas *de novo* y el sistema transportador de electrones mediado por citocromo, no son parte de su metabolismo, lo que los convierte en parásitos celulares. Sin embargo la mayoría de las especies puede cultivarse *in vitro* en medios bacteriológicos enriquecidos con precursores de ácidos nucleicos, (aportado por el extracto de levadura), y colesterol (aportado por el suplemento de suero) (Taylor-Robinson, 1994). Los micoplasmas son pleomórficos (Doane, 1980) contienen solamente una membrana celular y carecen de pared celular por lo que no son susceptibles a los antibióticos β -lactámicos y no toman la coloración de Gram. (fig 1)

Fig. 1: Microscopía electrónica de *M. hominis*. Localización extracelular en forma de un filamento alargado y ovoide (M). No hay pared celular. (C) y (N) : citoplasma y núcleo del cultivo celular. Magnificación : 45000X. Extraído de Anderson *et al*, J. Bacteriol. 90 : 5 (1965)



Filogenéticamente derivan de un ancestro anaeróbico bacteriano (clostridia). Taxonómicamente se encuentran dentro de la clase *Mollicutes* (“piel blanda”). El término micoplasmas es el que se suele utilizar para nombrar a todos los organismos de la clase *Mollicutes* que contiene cuatro órdenes, cinco familias y ocho géneros (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la clase *Mollicutes*

Orden I: *Mycoplasmatales*

Familia I: *Mycoplamataceae*

Género I: *Mycoplasma* (aprox. 100 especies)

Género II: *Ureaplasma*

Orden II: *Entomoplasmatales*

Familia I: *Entomoplasmataceae*

Género I: *Entomoplasma* (5 especies)

Género II: *Mesoplasma* (4 especies)

Familia II: *Spiroplasmataceae*

Género I: *Spiroplasma* (aprox. 11 especies)

Orden III: *Acholeplasmatales*

Familia I: *Acholeplasmataceae*

Género I: *Acholeplasma* (9 especies)

Orden IV: *Anaeroplasmatales*

Familia I: *Anaeroplasmataceae*

Género I: *Anaeroplasma* (4 especies)

Género II: *Asteroleplasma* (1 especie)

Alrededor de 180 especies parasitan animales, insectos, plantas y al hombre. (Dybving, 1996; Razin, 1998). Pocas especies son primariamente patógenas, aunque algunas son comensales, la mayoría de ellas son oportunistas.

En humanos y animales, los micoplasmas colonizan las membranas mucosas por lo que se encuentran en los tractos oro-respiratorio y genitourinario. Generalmente son específicos para cada hospedador, pero hay algunas especies como *Acholeplasma laidlawii* que es ubicuo, ya que se encuentra en distintas especies animales y en plantas. (Tully, 1979). Estos microorganismos también se hallan con frecuencia en cultivos celulares y, considerando al cultivo celular como un sistema viviente, la presencia de micoplasmas en este sistema debe ser considerada una infección en vez de una contaminación. (McGarrity, 1985).

Las fuentes de infección de los cultivos celulares por micoplasmas pueden ser el suero animal utilizado como suplemento de los medios de cultivo, líneas celulares o cultivos primarios infectados y el operador. El suero bovino es la principal fuente de *A. laidlawii* y *M. arginini*, y con menor frecuencia de *M. bovis*, *A. axacantum* y *M. bovoculi*. (Timenetsky, 1998) (Mc Garrity, 1985). También se puede encontrar *M. hyorhinis*, de origen porcino, por contaminación en los mataderos donde se extrae el suero. El operador es una fuente de micoplasmas humanos, principalmente *M. orale*, *M. salivarium*, y *M. fermentans*. (Timenetsky, 1998). Si no se implementan buenas prácticas de laboratorio pueden producirse infecciones. Si bien los micoplasmas no son de vida libre y son más lábiles que las bacterias, los aerosoles generados pueden contaminar la mesada de trabajo, los materiales y las manos del operador. Dependiendo de la especie, pueden sobrevivir hasta siete días sobre una superficie. Las cabinas verticales de seguridad biológica son

muy útiles cuando se utilizan apropiadamente, de lo contrario son los lugares de diseminación de micoplasmas en el laboratorio (Timenetsky, 1998). Cuando se comenzó a cultivar tejidos y células, se acostumbraba a pipetear con la boca, aunque actualmente no se continúa trabajando de esa manera, las líneas celulares así infectadas fueron y son fuente de diseminación de micoplasmas de origen humano. Los tejidos de los que se parte para establecer los cultivos primarios también pueden estar contaminados (Girardi, 1965), por ejemplo, *Mycoplasma pirum* se detectó por primera vez en un cultivo primario de células humanas (Del Giudice, 1985). La manipulación de diferentes cultivos al mismo tiempo puede inducir la contaminación entre líneas celulares y la diseminación de micoplasmas de las células infectadas a las no infectadas. Con mucho menor frecuencia se pueden detectar otras especies como *Ureaplasma urealiticum*, *M. hominis*, *M. penetrans*, *M. faucium*, *M. lipophilum* y *M. buccale* de origen humano, *M. artritidis* y *M. pulmonis* de origen murino, *M. gallinarum* y *M. gallisepticum* provenientes de aves y *M. canis*, de origen canino. (Timenetsky, 1998)

La prevalencia de infección por micoplasmas en cultivos celulares varía entre el 10 y el 15%, en laboratorios de Europa y Estados Unidos (Tully, 1996). En 1991 se reportó una prevalencia del 70% en nuestro país (Coronato, 1991).

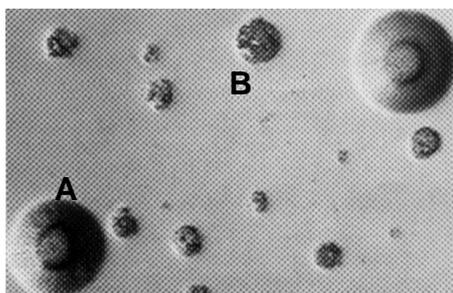
Los micoplasmas pueden producir alteraciones en las líneas celulares que infectan. Estas alteraciones son inducidas por los metabolitos (H_2O_2 , NH_3) y enzimas (superóxido dismutasa, lipasas, nucleasas y proteasas) que se producen durante su replicación en las células (Rodwell, 1967). Los cambios producidos pueden ser mínimos y al microscopio óptico pueden pasar desapercibidos observándose una organización celular normal. En ciertos casos se pueden evidenciar alteraciones en el crecimiento (McGarrity, 1985), en el metabolismo de

aminoácidos y nucleótidos (Levine, 1968) (Standbridge, 1971), y en la inducción de citoquinas (Taylor-Robinson, 1993), además pueden producirse aberraciones cromosómicas irreversibles (Fogh, 1967), transformación celular y efectos citogenéticos (Mc Garrity, 1984). La primera interferencia reportada de micoplasmas en la infección viral data de 1960 (Smith, 1960). Algunos micoplasmas no alteran el efecto citopático producido durante la replicación viral. Un cultivo celular infectado con micoplasmas puede comportarse de diferente manera, dependiendo de la especie de micoplasma, la línea infectada y el medio ambiente. Por ejemplo, las células HeLa infectadas por *M. orale* aumentan la producción del virus vaccinia pero disminuyen la de adenovirus, pero si las células HeLa están coinfectadas con diferentes cepas de micoplasmas, se obtienen distintos títulos de vaccinia. (Mc Garrity, 1985). La antigenicidad de Varicella zoster se ve disminuida ante la presencia de micoplasmas en las células (Timenetsky, 1998). *M. orale* frena el crecimiento del virus Sarcoma de Rous (Singer, 1973). Estos ejemplos indican que la infección altera la relación virus-célula de manera impredecible. Además hay que considerar que los cultivos celulares son utilizados en las fases iniciales de la producción de diferentes antígenos y antisueros. Se reportaron anticuerpos monoclonales anti - *M. hyorhinis* luego de la inmunización con cultivos infectados durante la producción de monoclonales anti-células tumorales (Vennegoor, 1982). Antígenos provenientes de sustratos celulares infectados por micoplasmas o los antisueros obtenidos por inoculación con estos antígenos contaminados, pueden dar lugar al desarrollo de reactivos diagnósticos de baja calidad principalmente en lo referente a la especificidad (Hemler, 1982). Debido a esto, en Estados Unidos se establecieron normas para regular el control de micoplasmas en líneas celulares utilizadas durante la producción de biológicos. (Quinnann, 2002).

Las mayoría de las especies que infectan cultivos celulares no constituyen un riesgo para el operador. *M. salivarium*, *M. orale*, *M. buccale*, *M. faucium* y *M. lipophilum*, forman parte de la flora oral normal (Tully, 1993), por lo que el contacto con estas cepas no sería riesgoso. Las especies patógenas para el hombre son *M. hominis*, *U. urealyticum* y *M. fermentans*. Cabe destacar que *M. fermentans* es una de las especies que infecta cultivos celulares con mayor frecuencia; se encuentra en faringe y se vincula a síndrome de distress respiratorio en el adulto (Lo, 1993), además se lo asoció al aumento de patogenicidad del HIV en linfocitos CD4+ (Kovacic, 1996) (Katzeni, 1993). La infección de los cultivos por micoplasmas es una razón más por la cual las líneas celulares deben trabajarse en cabinas de seguridad biológica.

Considerando los problemas que acarrea utilizar líneas celulares infectadas con micoplasmas, es de vital importancia detectar la infección en los laboratorios que utilizan cultivos celulares. La detección puede hacerse en forma directa sembrando la muestra en caldo y agar en anaerobiosis. El cultivo puede ser muy lento -hasta 6 semanas-, la colonia tiene forma característica de "huevo frito" pero la observación es difícil debido al tamaño y a la formación de pseudocolonias de cristales precipitados del medio (Dmochowsky, 1967) (fig. 2), además hay cepas no cultivables (Del Giudice, R 1980).

Fig. 2 : Cultivo de micoplasmas en agar. A: Colonias de micoplasmas. Contraste de fase. Magnificación 270X B) Pseudocolonia de cristales



Las dificultades inherentes al cultivo, propiciaron el desarrollo de métodos de detección más rápidos tales como los ensayos bioquímicos basados en la citotoxicidad mediada por adenosina fosforilasa, enzima presente en micoplasmas y ausente en células de mamífero (Mc Garrity, 1985). Otros investigadores realizaron la observación directa de las células en busca del microorganismo mediante microscopía electrónica. (De Harven, 1973) (Ho, 1977). También se pueden detectar antígenos micoplasmiales en los cultivos infectados mediante ELISA de captura o la técnica de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales (Freiberg, 1990). Otros métodos de detección de micoplasma se basan en la tinción inespecífica del DNA con fluorocromos tales como el DAPI (4', 6 diamidino 2 fenilindol dihidrocloruro) y el bisbenzimidazol o colorante de Hoechst (Chen, 1977) que se intercalan entre la doble hélice del DNA. Se han desarrollado también técnicas de hibridización del DNA utilizando sondas ribosomales específicas que permiten detectar la infección, (Mycoplasma T C, Gen - Probe, Estados Unidos) (Manual Workshop American Type Culture Collection (ATCC), 1997). Las técnicas arriba mencionadas presentan una especificidad y sensibilidad moderada. Por eso, se recomienda la combinación de varias técnicas para la detección de la infección. (Uphoff, 1992).

Gracias al advenimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede contar con una técnica para la detección de micoplasmas que presenta una sensibilidad y especificidad superior a los métodos anteriormente citados (Kirchov & Smith, 1995). Actualmente es posible contar con diferentes PCR que utilizan primers complementarios dirigidos a distintas regiones del genoma. (Mycoplasma PCR ELISA, Roche, Alemania ; Mycoplasma PCR primer set, Stratagene, Estados Unidos, Mycoplasma Detection Kit cat. 90-

1001K, ATCC, EEUU; (Harasawa, 1993) (Drussurget, 1994). A través de esta técnica se están controlando productos inmunobiológicos con posible infección por micoplasmas. (Nicholson, 2000)

Varios investigadores (Hay, 1989) recomiendan que toda vez que se detecta que un cultivo celular infectado, se debe descartar y reemplazarlo por uno libre de micoplasmas. Sin embargo algunos cultivos son irremplazables, o como ocurre en países en vías de desarrollo, la disponibilidad de nuevas líneas está limitada por el tiempo y el costo y no se puede tener acceso a una semilla libre de micoplasmas. En estos casos se intenta tratar las líneas celulares infectadas con el objeto de eliminar la infección.

En un principio, la eliminación de la infección se realizaba mediante el tratamiento con suero hiperinmune (Jeanson, 1985) y exposición a macrófagos murinos (Pollok, 1963), pero este tratamiento, además de laborioso, es poco efectivo (Jones, 1997). Esto llevó al tratamiento de las células infectadas con diferentes antibióticos (ATB) tales como tiamulina, minociclina (MIN) (Schmidt, 1984), kanamicina, cloromicetina, novomiocina o la combinación de tilosina (TIL)- MIN y TIL - tiamulina. (Coronato, 1994) (Hay, 1989) enrofloxacina (Fleckenstein, 1994), espectinomicina (Visser, 1999). Lamentablemente, a pesar de los resultados promisorios logrados, hay muy poca información acerca de las especies que son sensibles a los tratamientos con los ATB recomendados. Además no están estandarizados los parámetros del tratamiento que tengan en cuenta la línea celular, la dosis tóxica y el tiempo de tratamiento.

Objetivo general

Detectar y caracterizar la infección por Micoplasmas en líneas celulares y normatizar su eliminación mediante tratamiento antibiótico.

Objetivos específicos

- Detectar la presencia de micoplasmas en cultivos celulares mediante PCR y tinción de ADN
- Tipificar las cepas encontradas mediante su análisis con enzimas de restricción y ELISA.
- Estandarizar un método de eliminación de diferentes especies de micoplasmas que infectan los cultivos celulares.
- Evaluar si el tratamiento con ATB afecta el comportamiento de los cultivos celulares

Materiales y Métodos

Detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante tinción de ADN y PCR.

Líneas celulares

En el siguiente cuadro se describen las 24 líneas celulares analizadas para detectar una posible infección con micoplasmas, detallando su especie de origen: humano, simiano, canino y murino, y su forma de crecimiento, en suspensión (sus) o en monocapa (mc), provenientes de laboratorios externos y del nuestro.

Línea celular	Especie de origen	Observaciones
PTP	humano	Fibroblastos de prepucio (mc)
HeLa	humano	Carcinoma de útero (mc)
HEp-2	humano	Carcinoma laríngeo (mc)
Caco-2	humano	Carcinoma de colon (mc)
CaSki	humano	Carcinoma de útero, que tiene integrado el virus papiloma al genoma celular (mc)
RD	humano	Rhabdomiosarcoma, (mc)
Raji	humano	Linfocitos B provenientes de linfoma de Burkitt, que tienen integrado parte del genoma del virus Epstein Barr (EBV) (sus)
P3HR-1	humano	Linfoma de Burkitt productor de EBV (sus)
BCBL-1	humano	Linfocitos B que poseen genoma de Herpesvirus Humano 8 (NIH AIDS Research Program) (sus)
K562	simiano	Linfocitos provenientes de leucemia mielógena crónica simianas (sus)

Vero y VERO76	simiano	Riñón de mono verde (mc)
LLC-MK ₂	simiano	Riñón de mono Rhesus (mc)
Ma-104	simiano	Riñón de mono Rhesus (mc)
FRhK-4	simiano	Riñón de mono Rhesus (mc)
B95-a	simiano	Linfocitos de marmoset, adaptadas de la línea en suspensión B95-8 para crecer dependientes de anclaje (mc)
MDCK	canino	Riñón (mc)
Mc Coy	murino	Fibroblastos de ratón (mc)
L929	murino	Fibroblastos (mc)
L20B	murino	Derivadas de L929 transfectadas con un receptor para poliovirus (mc)
Y-1	murino	Células adrenales (mc)
COS-7	Murino	Fibroblastos transfectados con la proteína t del virus SV40 (mc)
C ₂ C ₁₂	murino	Mioblastos (mc)
Sp2/0	murino	Híbridoma no secretor (sus)
XS63	murino	Mieloma no secretor (sus)

Medios de cultivo:

Medio Esencial Mínimo (MEM) (Sigma M0643) base Earle, con amino ácidos no esenciales, adicionado con 7% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco 26300), para RD, HEp-2, CaSki, Caco-2, HeLa, LLC-MK₂, FRhK-4, Ma-104, B95-a, McCoy, MDCK, L20B y L929, con 7% SFB más 15% de suero equino (Sigma H1270) para Y-1, con 10% SFB para PTP y C₂C₁₂; Medio 199 (Gibco 31100-035), con 7% SFB para Vero y VERO 76; Medio Iscove`s (Sigma I3390) con 7% SFB para Raji, P3HR-1 y B95-a; RPMI 1640 (Sigma 6504), con 7% SFB para XS63, Sp2/0, COS-7 y BCBL-1. Las líneas celulares fueron mantenidas en medios libres de antibióticos.

Cepas patrones de micoplasmas:

Se utilizó DNA de cepas de *M. hyorhinis* (ATCC 17981D), *M. arginini* (ATCC 23838D), *M. fermentans* (ATCC 19989D) y *M. orale* (ATCC 23714D). Los liofilizados de DNA fueron adquiridos en ATCC. El DNA se reconstituyó con agua bidestilada estéril, según las especificaciones de ATCC, para obtener una concentración final de 50 ng/ µl.

Detección de la infección por micoplasma mediante la tinción de DNA con colorante intercalante - Coloración de Hoechst

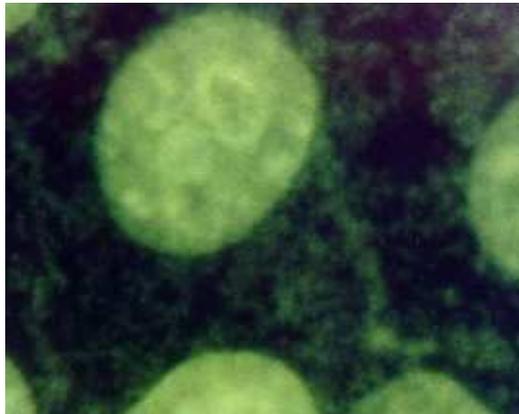
Se sembraron 100µl de una suspensión con 20000 células /ml por fosa en portaobjetos de 16 fosas (LAB-TEK, NUNC). Luego de 24 horas, las células se colorearon según el método de Chen (Chen, 1977), se fijaron con metanol : acético 3:1 y se tiñeron con una solución al 0.05 % (P/V) de bisbenzimidazol (Hoechst 33258, Sigma b1155), luego se montaron con buffer de Mc Ilvaine (0.044M de ácido cítrico, 0.111M de fosfato monoácido de sodio), pH 5.4 y se observaron al microscopio de fluorescencia con filtro excitador BG12 y una combinación de filtros barrera 56/44 (Zeiss, Alemania).

Las muestras negativas presentan fluorescencia verde nuclear y no se observa el citoplasma (fig.3). Se considera positiva la presencia de puntillado fluorescente verde citoplasmático (fig.4), que puede presentarse en acúmulos o en forma homogénea sobre el citoplasma celular. El resultado positivo se expresó en cruces (+--- a +++) según se encontrara fluorescencia característica para micoplasmas en el 1-25% de las células (+---), 26-50% (++--), 51-75% (+++-) y en el 100% (++++) de las células.

Figura 3: Células no infectadas. Magnificación 400X



Figura 4: Células infectadas (++++). Magnificación 400X



Detección de la infección por micoplasma por PCR

Tratamiento de la muestra para PCR

Para la reacción de PCR, se separó una alícuota de 250000 células de cada muestra a analizar. Las células se centrifugaron y el pellet se resuspendió en 50 µl de medio adecuado. La extracción de DNA se realizó según el método de Casas et al (Casas, 1995). Las células resuspendidas se digirieron en una proporción 4:1 vol buffer lisis / vol celular, con un buffer de lisis compuesto por 3,2 M de isotiocianato de guanidina, 0,62 mM de citrato de sodio, 0001 mM de ditioneitol, 8.3 % P/V de sarcosyl y 1µg de glicógeno por µl de solución durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó alcohol isopropílico 1:1 V/V. El digesto se centrifugó durante 20 minutos a 14000 rpm en microcentrífuga (Eppendorf modelo 5417R), el pellet se lavó con etanol 70°. El extracto seco de ADN se resuspendió con 10 µl de agua bidestilada estéril. Para cada reacción se usaron 5µl de este extracto. El resto se conservó a -70°C para posteriores ensayos.

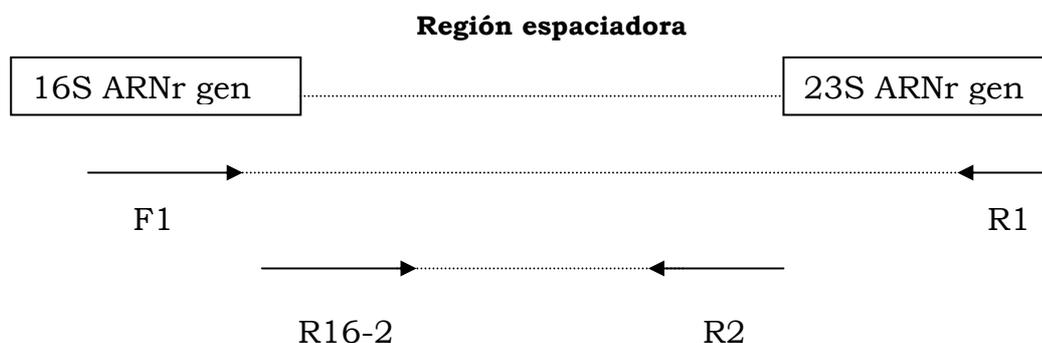
Como control negativo se utilizó ADN de células provenientes de laboratorios de referencia internacional cuya coloración de H \ddot{o} chst fue negativa luego del primer repique en nuestro laboratorio. Como control positivo se utilizó ADN de células positivas por la coloración de H \ddot{o} esch y las cepas de referencia de *M. arginini*, *M. hyorinis*, *M. orale* y *M. fermentans* (ATCC).

Reacción de PCR

Se realizó una nested PCR sobre 5 µl de muestra o control negativo preparados según el protocolo arriba mencionado. Se utilizaron los primers descritos previamente dirigidos al operón de la región

espaciadora de ARN ribosomal de 16S y 23S de micoplasmas: F1: 5'-acaccatgggagctgtaat-3', R1: 5'-cttcacgcgactttcagaccaagg-3', en la primera ronda y para la segunda, los primers R2: 5'-gcatccaccaaactct-3', R16-2: -gtgcggtggatcacctct- (Harawasa, 1993) (fig. 5). Estos primers permiten detectar la mayoría de las cepas que infectan cultivos celulares. Las diferencias en la secuencia de esta región permiten la identificación de las especies detectadas por análisis de restricción enzimático (RFLP) sobre el amplicón obtenido de *M. pirum*, *M. fermentans*, *M. orale*, *M. arginini*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. hyorhinis*, *M. salivarium*, *M. laidlawii* y de *M. pneumoniae*, que si bien no infecta cultivos celulares, suele hallarse en muestras clínicas (Harawasa, 1993).

Fig. 5: Diagrama de la región amplificada, localizaciones y orientaciones de los primers.



Se empleó el protocolo de perfil de temperaturas descrito por Hu y Buck (Hu, 1993). Separación de doble hélice: 94°C 2 minutos; desnaturalización a 94°C 30 segundos, renaturalización a 55°C 2 minutos y elongación: 72 °C 2 minutos, por 30 ciclos; extensión final: 72°C, 5 minutos. La mezcla de reacción consistió en 20 pm de cada

primer (Life Technologies), 10 mM de Tris – HCl pH 8.3; 50 mM de KCl₂, dNTPs: 2.5 µM cada uno (Perkin Elmer, N 801-0055); 2mM de Cl₂Mg, 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer, N801-0055), agua bidestilada estéril: csp 50 µl.

Dependiendo de la cepa investigada el tamaño de los amplificados varió entre 370 a 490 pares de bases para la primera ronda y de 219 a 365 para la segunda. El producto de amplificación se visualizó luego de 30 minutos de electroforesis a 100V, en gel de agarosa grado electroforético (ICN, 100267) al 2% (P/V) en buffer TBE (Sambrok, 1989) con 5µg de bromuro de etidio por ml de gel.

Sensibilidad de la reacción:

La sensibilidad de la reacción se determinó por amplificación de diferentes concentraciones de ADN de cepas patrones de *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans* y *M. orale*. El rango de concentraciones ensayadas varió entre 20 pg/µl a 0,0002 pg/µl.

Para determinar si el ADN celular interfería en la sensibilidad de la reacción, se repitió la curva anterior con el agregado de ADN extraído de 125000 células no infectadas, que es la cantidad de células utilizadas en cada reacción de PCR.

Especificidad

Para determinar si la reacción de PCR para micoplasmas era capaz de amplificar inespecíficamente el DNA celular, se realizó la PCR sobre el ADN extraído de LLC-MK₂, Vero, MDCK, RD, HEp-2, y PTP, previamente negativas según la coloración de H \ddot{o} echst.

Tipificación de las cepas

Análisis de restricción enzimática (RFLP)

El producto amplificado de la segunda ronda de PCR se digirió con VSP I (Promega R6851), Hind III (Promega R6041), y Cla I (Promega R6551) (Hu, 1995) para identificar las especies por mapeo de restricción.

La mezcla de reacción consistió en 3 µl del buffer apropiado para cada enzima, 10 unidades de enzima, 16 µl de ADD y 10 µl del producto amplificado en la segunda ronda. La digestión se realizó en los tres casos durante 14 horas a 37°C, con un posterior calentamiento a 95°C, durante 1 hora.

Los productos de la segunda ronda de PCR y los obtenidos por digestión enzimática se sembraron en un gel de agarosa Nu-Sieve (BMA, 50091) al 4% (P/V) en buffer TBE (Sambrok, 1989) con 5 µg de bromuro de etidio por ml de gel. Se corrieron 55 minutos a 100 voltios y se visualizaron sobre un transiluminador a la luz UV.

Para corroborar el patrón de bandas obtenido, se digirieron y corrieron en paralelo amplificados de cepas patrones: *M. orale*, *M. arginini*, *M. fermentans* y *M. hyorhinis*.

El resultado de la restricción se evaluó de acuerdo a los valores esperados para los productos de restricción de los amplificados de la segunda ronda (tabla 2), comparando el tamaño de las bandas con el patrón de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Life Technologies, 15628-019)

Tabla 2: Tamaño de bandas esperados (pb) de los amplificadores antes y después de la digestión enzimática

Espece	Producto	VSPI	HIND III	CLA I
<i>M. fermentans</i>	365	270-95	241-124	-
<i>M. orale</i>	290	151-139	-	-
<i>M. arginini</i>	236	134-102	-	-
<i>M. hyorhinis</i>	315	-	-	253- 62
<i>M. salivarium</i>	269	-	-	-
<i>A. laidlawii</i>	430-223*	-	-	-
<i>M. genitalium</i>	252	190-62	-	-
<i>M. pirum</i>	323	169-154	285-28	-
<i>M. hominis</i>	236	123, 113	-	-
<i>M. pneumoniae</i>	280	-	-	-

**A. laidlawii* produce dos bandas dado que posee dos operones en la región espaciadora interribosomal, mientras que el resto de los micoplasmas tiene una solo operón y produce una sola banda.

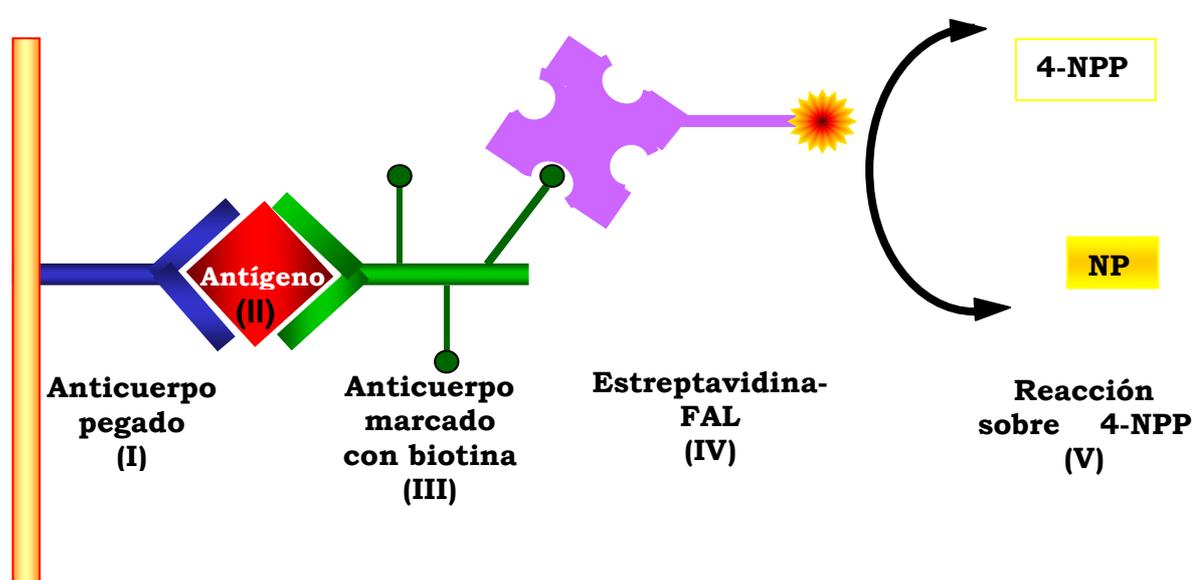
Enzimoimmunoensayo de captura (ELISA)

Para identificar las cepas encontradas se utilizó un ELISA (Mycoplasma Detection Kit, Roche Molecular Biochemicals 1296744, Alemania) con anticuerpos policlonales dirigidos contra: *M. orale*, *M.arginini*, *M. hyorhinis* y *A. laidlawii*. La determinación de cada una de las especies se realizó por separado.

Las muestras ensayadas correspondieron a suspensiones celulares (125000 - 500000 células por fosa en medio de cultivo), que se procesaron por duplicado siguiendo las especificaciones del fabricante del equipo.

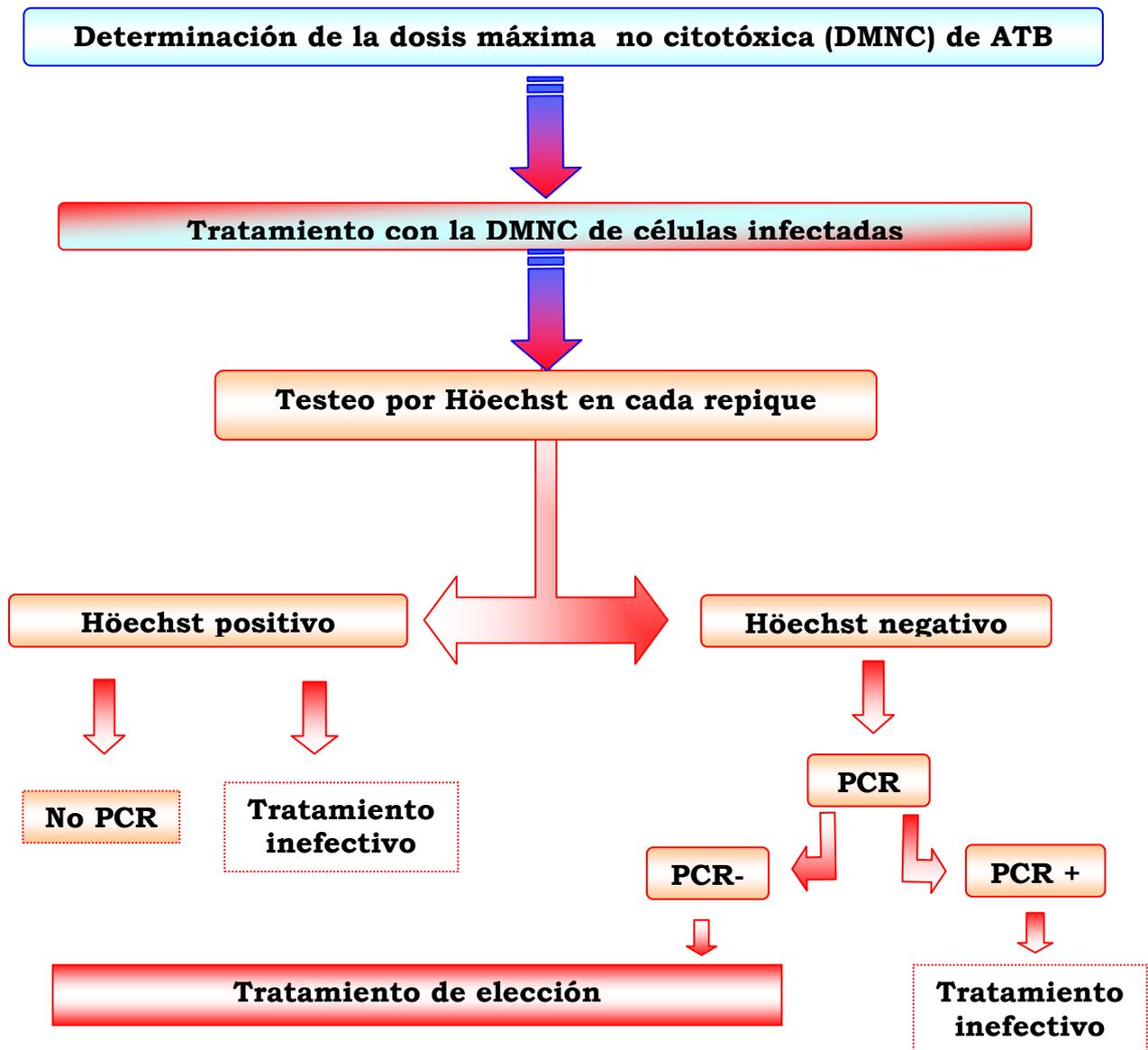
En un primer paso (fig. 6), el primer anticuerpo se fijó por adsorción a las placas (I), y se bloquearon los sitios inespecíficos de unión. En un segundo paso (II), se cubrió la placa con la muestra problema, (sobrenadante de cultivos celulares, suspensión celular, medio) y los controles provistos por el fabricante (sobrenadante de cultivos de micoplasmas). Los antígenos (micoplasmas o fragmentos de micoplasmas) se unen al correspondiente anticuerpo adsorbido en (I). En un tercer paso (III), el antígeno fijado se unió al anticuerpo marcado con avidina biotina. Este conjugado se visualizó por la unión de streptavidina - fosfatasa alcalina (FAL) (IV) que actúa enzimáticamente sobre 4-nitrofenilfosfato (4-NPP) como sustrato (V) produciendo una coloración amarilla en la fosa positiva e incolora en la negativa.

Figura 6 : Esquema de ELISA



Estandarización de un método de eliminación de diferentes especies de micoplasmas que infectan cultivos celulares.

El siguiente diagrama de flujo muestra la estrategia utilizada para la elección del tratamiento antibiótico.



Determinación de la dosis máxima no citotóxica de ATB

Se ensayaron los siguientes antibióticos: tartrato de tilosina (TIL) (Sigma, cat T6271), potencia 900µg/mg; clorhidrato de minociclina (MIN) (Cynamid), potencia: 845 µg/mg, y azitromicina (AZM) (Serv. Antimicrobianos. INEI / ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”), potencia 0,940 µg / mg. Todos los ATB se prepararon a partir de una solución madre 100X, que se agregó a los medios de cultivo. Para TIL, se ensayaron concentraciones de 100, 125, 150, 200, 250 µg /ml, tomando como base reportes previos (Coronato, 1994). Para MIN se probaron 5, 10 y 20 µg /ml, en las mismas líneas celulares, tomando como referencia trabajos anteriores (Coronato, 1994) (Schmidt, 1984). La toxicidad de AZM se realizó a concentraciones de 10, 20, 30, 50 y 100 µg /ml. La AZM, por ser una droga liposoluble, se disolvió previamente en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Como controles se utilizaron MEM más 7% de SFB y 0,1% de DMSO, siendo ésta la concentración final de DMSO equivalente a la utilizada como solvente en la mayor concentración de AZM. Se incluyeron controles celulares de cada línea que eran mantenidos con los mismos medios sin ATB y un blanco de MEM más 2% de SFB sin DMSO.

Las células empleadas en el ensayo de citotoxicidad fueron RD, HEp-2, Vero, LLC-MK₂ y MDCK.

Las distintas diluciones de cada ATB en medio de mantenimiento (MM) se adicionaron sobre monocapas de 24 horas, según figura 7 (tiempo 0). A las 72 hs se tripsinaron, se realizó un recuento con el colorante vital azul tripán (Phillips, 1973) en cámara de Neubauer (Absher M, 1973) y se repicaron a una placa de 24 fosas con medio de crecimiento (MC) adicionado con las diferentes diluciones de cada ATB. 72hs después de este repique, (6 días desde el agregado inicial de los ATB),

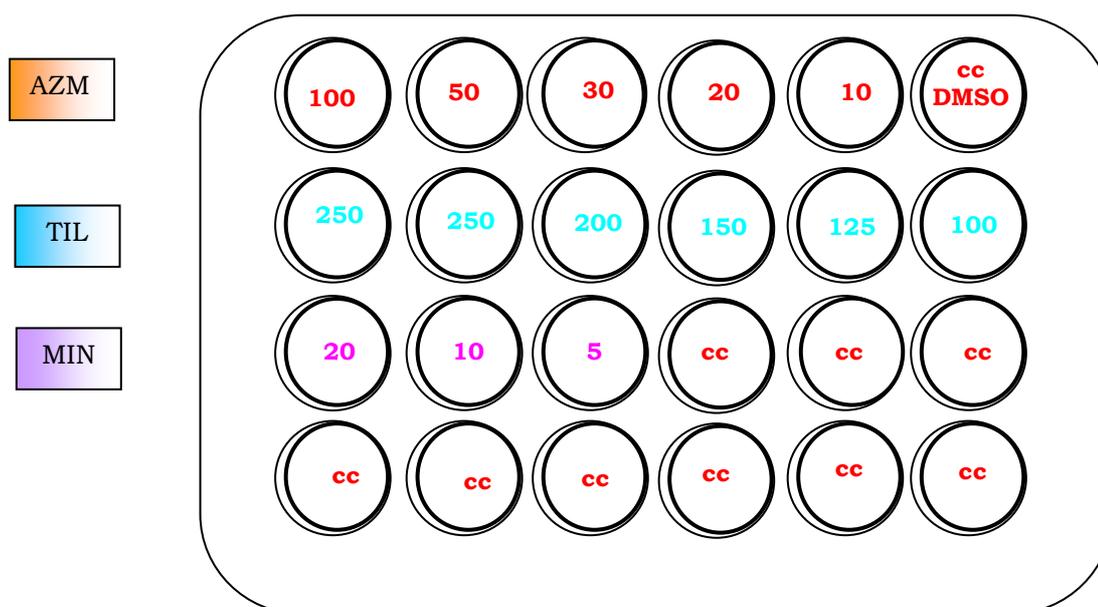
las células se contaron con azul tripán. Las características morfológicas se observaron y registraron diariamente durante el ensayo de citotoxicidad (6 días) por observación al microscopio óptico.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

a) Características morfológicas: pérdida de límites intercelulares, pérdida de adhesividad al sustrato, redondeamiento, alargamiento celular, aparición de puntillado, vacuolas, policariocitos, fusión. Se consideró citotóxica cualquier alteración de las características morfológicas.

b) Viabilidad: se evaluó la viabilidad de células tratadas y sin tratar (controles) por recuento de células con azul tripán. El resultado se expresó en porcentaje de células vivas respecto del control. Se estableció como la dosis de elección para efectuar el tratamiento ATB la concentración de droga que no provocara cambios morfológicos y cuya viabilidad fuera mayor al 65% en la mayoría de las líneas ensayadas.

Figura 7: Ensayo de citotoxicidad



Tratamiento de células infectadas con la DMNC

Las diluciones de repique para cada línea celular fueron: 1:6 para LLC-MK2, HEp-2 y RD; 1:8 para MDCK y 1:4 para Vero. Se utilizó MC adicionado con la dosis máxima no citotóxica elegida para cada ATB. Para cada línea celular se realizaron dos repiques semanales durante dos semanas. El último repique se mantuvo con medio con antibióticos hasta completar 15 días de tratamiento, a partir del cual las células se mantuvieron en medio libre de antibióticos. En cada repique se sembraron microplacas LAB-TEK para realizar coloración de Hoescht (H) y se tomaron muestras para PCR.

Se realizó primero el tratamiento de la línea Vero levemente infectada con *M. orale*, H: (+---), ensayando los tres ATB. Se estableció como tratamiento de elección el que eliminó la infección por micoplasmas (H negativo, PCR negativa).

Posteriormente, basado en el resultado del ensayo para eliminar infecciones leves, se trataron en líneas infectadas con diferentes cepas de micoplasmas con grados variables de infección (H +--- a ++++), utilizando los ATB que hubieran eliminado la infección leve.

Se utilizaron las líneas LLC-MK2, (Hoescht ++--) infectada con *M. arginini*; McCoy (+++-) con una infección doble de *M. arginini* y *M. hyorhinis*; B95a (+---) (*M. orale*), y un cultivo de Vero (++++) (*M. orale*) en el que se habían observado y fotografiado cambios en la morfología normal de la línea celular.

Luego de finalizado el tratamiento, los cultivos se mantuvieron con medio sin ATB y a los diez días se controlaron por PCR y H.

Efecto del tratamiento

Efecto del tratamiento sobre el crecimiento celular

A fin de evaluar si el esquema de tratamiento afectaba el crecimiento celular, se estimó la tasa de crecimiento en líneas celulares libres de micoplasmas. Se utilizaron las siguientes líneas: LLC-MK2, Hep-2, RD, Vero y MDCK.

Cada línea celular se repicó dos veces por semana, durante diez días, con MC suplementado con 5µg/ml de MIN y en paralelo un control de cada línea con MC sin ATB.

Cada muestra (células tratadas y controles) se sembró por triplicado en una concentración de 25000 células / fosa (tiempo 0). Se realizó un recuento a las 24 horas y a los 3, 7 y 10 días de comenzado el tratamiento. Cada línea se repicó y se contó cada fosa por triplicado. Se obtuvo el promedio del número de células (nueve conteos) en los controles y en las tratadas.

Se calculó la tasa de crecimiento para cada línea celular como la razón entre el promedio de los recuentos de las células tratadas y los controles.

Efecto del tratamiento ATB sobre la sensibilidad celular a la infección viral:

A efectos de evaluar si se afecta su sensibilidad a la infección viral luego del tratamiento ATB elegido, las células se infectaron con virus sarampión.

Se comparó el título de la cepa vacunal de sarampión a virus vivo (Rouvax, Pasteur Merieux, lote P5576, Centro Nacional de Control de Calidad de Biológicos, ANLIS Dr. C. G. Malbrán), sobre una monocapa

de células Vero no infectadas con micoplasmas y la misma línea celular de la cual se eliminó la infección con *M. orale* utilizando el tratamiento ATB establecido en el laboratorio (Vero tratadas).

La cepa de *M. orale* fue caracterizada por RFLP y ELISA.

La vacuna de sarampión se reconstituyó con 5 ml de eluente de acuerdo a lo recomendado por el laboratorio productor.

Se prepararon suspensiones de 100000 células/ml en medio 199 adicionado con 7 % de SFB y se sembraron 100 µl por fosa en placas de 96 fosas (IWAKI, 3861096), media placa con células Vero y la otra mitad con Vero tratadas. Se incubaron durante 24 – 48 horas hasta confluencia.

Titulación viral

Se diagramó un esquema (figura 8) teniendo en cuenta que:

- La cantidad mínima de placas a ensayar debe ser 3 (valor estadístico mínimo para tener 3 puntos para calcular desvíos estándares, observar variaciones o confrontar valores)
- Ambas líneas celulares deben estar en la misma placa
- Son necesarias 4 diluciones de la vacuna para observar un valor de corte (-2 a -3,5 en este caso)
- Tres series de dilución de la vacuna (A, B y C) se siembran en la misma placa

Figura 8. Titulación de la vacuna de sarampión

	Serie	A				B				C				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	-2 ⇒	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	cc
B	-2,5⇒	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
C	-3 ⇒	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
D	-3,5⇒	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
E	-2 ⇒	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	cc
F	-2,5⇒	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	
G	-3 ⇒	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	
H	-3,5⇒	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□	

■ Vero □ Vero tratadas cc : control de células (A12 y E12)

A, B, C: series de diluciones (sd) de la cepa de sarampión, desde -2,5 a -3,5.

Las diluciones de la vacuna reconstituída se prepararon en Medio 199 adicionado con 2% SFB. Las placas se vaciaron por volcado y se inocularon 100 µl de cada dilución de la vacuna y 100 µl del mismo medio para los controles.

Las placas inoculadas se incubaron a 37°C en atmósfera gaseada con 5% CO₂ y se observaron diariamente, la lectura final se realizó el sexto día post infección. La dosis infectiva 50 en cultivo celular (CCID₅₀), se determinó por el método de Reed & Muench (Reed, L & Muench, H, 1938).

Análisis estadístico:

Se analizaron los títulos obtenidos por los test estadísticos apropiados en cada caso: prueba t (student) para comparación de 2 medias de dos muestras independientes, análisis de varianza de un factor, para comparación de desvíos estándares y ANVA, análisis de varianza para dos factores.

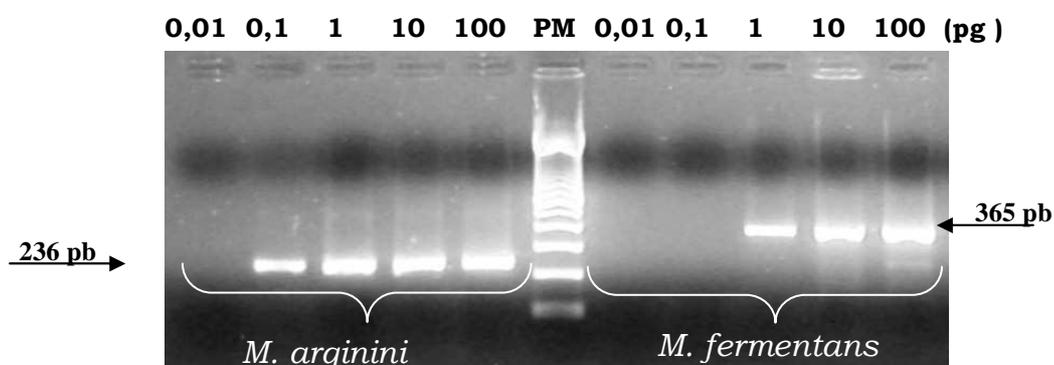
Resultados

Detección de cultivos celulares infectados con micoplasmas por PCR y tinción de ADN.

Sensibilidad de la PCR:

Cuando se determinó la sensibilidad de la reacción por amplificación de las diferentes concentraciones de ADN de las cepas patrones, se encontró un límite de detección de 0,1 pg de ADN de *M. arginini* y 1 pg de ADN de *M. fermentans*, *M. orale*, y *M. hyorhinis*. En la figura 9 se muestran los resultados correspondientes a *M. arginini* y *M. fermentans*.

Figura 9 : Sensibilidad de la PCR



Interferencia de ADN celular en la detección de micoplasmas:

La cantidad de ADN extraída de 125000 células (total de células utilizado para detectar micoplasmas en líneas celulares) no alteró la sensibilidad de detección, observándose el mismo límite de detección de

ADN para todas las cepas de micoplasmas en presencia de ADN eucariota.

Detección de cultivos infectados

Se evaluaron 110 muestras de cultivos celulares provenientes de 8 laboratorios, utilizando la tinción de Hoescht y PCR. En 74 muestras se realizaron ambas técnicas. (tabla 3).

Tabla 3: Comparación de resultados de tinción de Hoescht vs. PCR

	Coloración de Hoescht				TOTAL
	RESULTADOS	POSITIVO	NEGATIVO	DUDOSO	
PCR	POSITIVO	12	4	2	18
	NEGATIVO	0	54	2	56
	TOTAL	12	58	4	74

De 74 muestras evaluadas por ambos métodos, 18 muestras fueron positivas (+). Doce muestras fueron positivas por Hoescht y por PCR. De las 58 muestras negativas por Hoescht, 54 fueron (-) y 4 (+) por PCR. Cuatro muestras teñidas por coloración de Hoescht no pudieron leerse por razones técnicas, o características propias de la muestra, como avidez del citoplasma por el colorante, que produce un fondo fluorescente que imposibilita la lectura. Estas muestras se registraron como dudosas o indeterminadas; sin embargo, las 4 se pudieron procesar para PCR, de las cuales dos fueron positivas y dos negativas. También se evaluaron 36 muestras sólo por PCR en las que se encontraron dos muestras positivas.

Del total de 110 muestras procesadas por PCR, 20 (18%) fueron positivas, 10/20 provinieron de laboratorios externos (50%) y 10/20 de nuestro laboratorio (50%), de estas últimas 6/10 provenían del banco de células previo al control de micoplasmas. Las 4 restantes se detectaron en el control de rutina.

Tipificación de las cepas encontradas por análisis con enzimas de restricción y por ELISA

Tipificación con enzimas de Restricción:

Las 20 muestras positivas por PCR se tipificaron por RFLP.

En las figuras 10, 11, 12 y 13 se muestran los diferentes patrones de digestión obtenidos de cepas de referencias y cepas detectadas en los cultivos celulares infectados.

Fig. 10: RFLP de cepa patrón de *M. orale*

Calle 1	Calle 2	Calle 3	Calle 4	Calle 5
s/cortar 290pb	PM	VSP I : 151-139pb	Hind III: 290 pb	CLAI : 290 pb

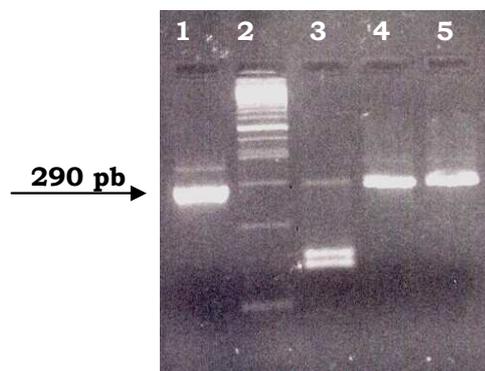


Fig. 11: RFLP de cepas patrones (ATCC) y muestras

Calle	Amplificado de:	Cepa	Tamaño(pb):			
			sin digerir	Digerido con:		
				VSP I	CLA I	HIND
1	Cepa ATCC	<i>M. arginini</i>	236			
2	Cepa ATCC	<i>M. arginini</i>			236	
3	Cepa ATCC	<i>M. arginini</i>				236
4	Cepa ATCC	<i>M. arginini</i>		100-136		
5	Cepa ATCC	<i>M. fermentans</i>	365			
6	Cepa ATCC	<i>M. fermentans</i>			365	
7	Cepa ATCC	<i>M. fermentans</i>				241-124
8	Cepa ATCC	<i>M. fermentans</i>		270-95		
9	Cepa ATCC	<i>M. hyorhinis</i>	315			
10	Cepa ATCC	<i>M. hyorhinis</i>			253- 62	
11	Cepa ATCC	<i>M. hyorhinis</i>				315
12	Cepa ATCC	<i>M. hyorhinis</i>		315		
13	Marcador de peso molecular					
14	Muestra 1	<i>M arg- M. hyor</i>	315-236			
15	Muestra 1	<i>M arg.-M. hyor</i>			236- 253-62	
16	Muestra 1	<i>M arg.-M. hyor</i>				315-236
17	Muestra 1	<i>Marg- M. hyor</i>		310-100-140		
18	Muestra 12	<i>M. fermentans</i>	365			
19	Muestra 12	<i>M. fermentans</i>			365	
20	Muestra 12	<i>M. fermentans</i>				124-241



Figura 12: RFLP de muestras con VSPI

DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN				
CALLE	Producto de Muestra	SIN CORTAR	CON VSP1	ESPECIE
1	Marcador de peso molecular			
2	2	290		<i>M. orale</i>
3	2		151 - 139	
4	3	315 - 236		<i>M. hyorhina</i> <i>y M. arginini</i>
5	3		315-102-134	
6	9	236		<i>M. arginini</i>
7	9		102 - 134	
8	8	315		<i>M. hyorhina</i>
9	8		315	
10	16	315		<i>M. hyorhina</i>
11	16		315	
12	11	236		<i>M. arginini</i>
13	11		102 - 134	
14	ATCC	315		<i>M. hyorhina</i>
15	ATCC		315	
16	16	315		<i>M. hyorhina</i>
17	6	315 - 236		<i>M. hyorhina</i> - <i>M. arginini</i>
18	6		315-102-134	
19	5	290		<i>M. orale</i>
20	5		151 -139	

Las bandas de 315 fueron cortadas con CLA1 resultando dos bandas de 253 y 62 pb (datos no mostrados)

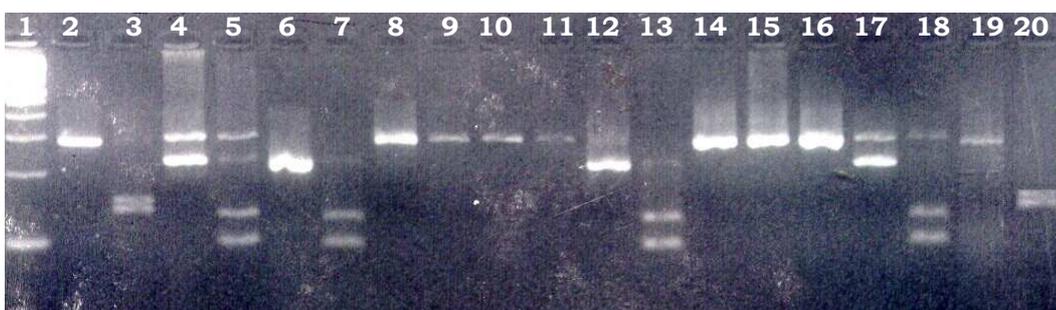
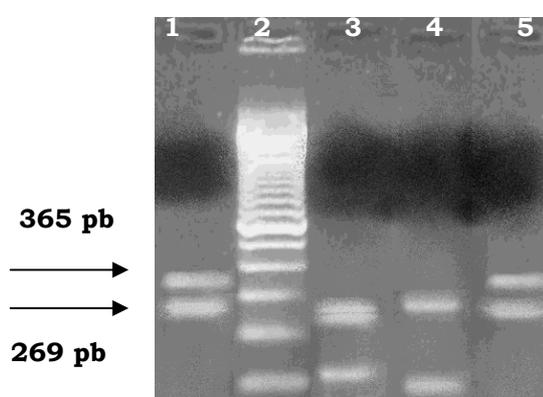


Figura 13: RFLP de la muestra 10 infectada con *M.salivarium* y *M. fermentans*

Calle1	Calle 2	Calle 3	calle 4	Calle5
s/cortar 365- 269	PM	HindIII 269 -241- 124	VSPI 269-270-95	Cla I 269-365



Tipificación por ELISA

Se analizaron por ELISA 14 de las 20 muestras previamente tipificadas por análisis de restricción, 6 no pudieron analizarse por falta de muestra. Las cepas encontradas fueron: *M. orale*, *M. hyorhinitis* y *M. arginini*. En la figura 14 se muestran los resultados de 4 de las 14 muestras en la placa de ELISA donde se ensayaron por duplicado las muestras 1, 7, 8 y 4, según se detalla a continuación.

Las fosas positivas presentan una coloración amarilla y las negativas incoloras .

Figura 14: Placa revelada

Línea	Columnas					
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12
	Muestra 1	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 4	Control negativo	Control positivo
A (anti. <i>M. arginini</i>)	+	+	-	-	-	+
B (anti <i>M. hyorinis</i>)	+	-	+	-	-	+
C (anti. <i>A. laidlawii</i>)	-	-	-	-	-	+
D (anti <i>M. orale</i>)	-	-	-	+	-	+

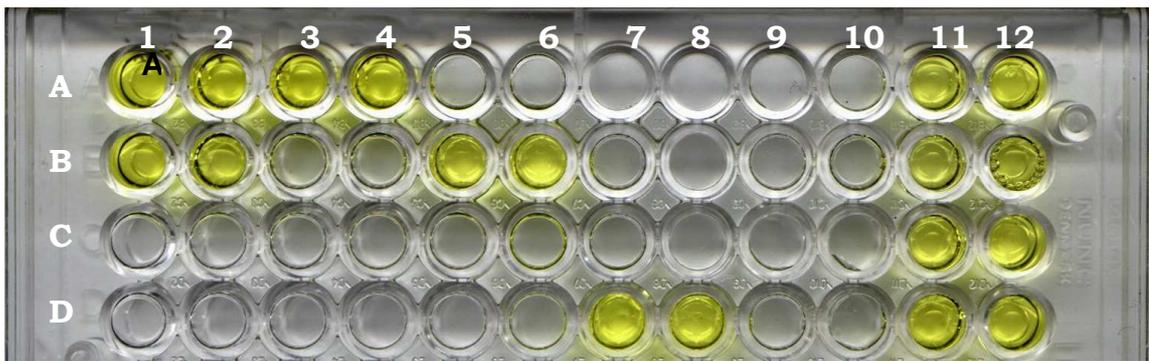


Tabla 4 : Detección y tipificación de micoplasmas por todas las técnicas empleadas

Muestra	Línea	Origen	Höchst	PCR	ELISA	RFLP
1	HEp-2	Lab. 1	-	+	<i>M. arginini – M. hyorhins</i>	<i>M. arginini - M. Hyorhins</i>
2	Vero	Lab. 2	++++	+	<i>M. orale</i>	<i>M. orale</i>
3	McCoy	CT	+++-	+	<i>M. arginini- M. hyorhins</i>	<i>M. arginini - M. Hyorhins</i>
4	BHK 21	Lab. 2	++++	+	<i>M. orale</i>	<i>M. orale</i>
5	B95a (*)	Lab. 3	-	+	<i>M. orale</i>	<i>M. orale</i>
6	FrhK4	CT	++--	+	<i>M. arginini – M. hyorhins</i>	<i>M. arginini M. Hyorhins</i>
7	LLC-Mk ₂	CT	++--	+	<i>M. arginini</i>	<i>M. arginini</i>
8	RD	CT	-	+	<i>M. hyorhins</i>	<i>M. hyorhins</i>
9	HEp-2	Lab. 1	+---	+	ND	<i>M. arginini</i>
10	K562	Lab. 4	++++	+	Negativo	<i>M. fermentans – M. salivarium</i>
11	Y-1	CT	+---	+	<i>M. arginini</i>	<i>M. arginini</i>
12	Sp2/O	Lab. 5	ND	+	Negativo	<i>M. fermentans</i>
13	XS-63	Lab. 5	ND	+	Negativo	<i>M. fermentans</i>
14	LLC-MK2	CT	-	+	<i>M. arginini</i>	<i>M. arginini</i>
15	Vero	CT	D	+	<i>M. orale</i>	<i>M. orale</i>
16	HEp-2	Lab. 6	+---	+	<i>M. hyorhins</i>	<i>M. hyorhins</i>
17	HeLa	CT	D	+	ND	<i>M. orale</i>
18	Caski	Lab. 7	+---	+	ND	<i>M. fermentans</i>
19	PTP	CT	+---	+	ND	<i>M. orale</i>
20	MDCK	CT	+---	+	ND	<i>M. orale</i>

Lab. 1-7 : laboratorios externos. CT: Cultivo de Tejidos. D: dudoso. ND: no determinado () Se consideró el resultado del primer H de B95a.*

Se encontraron 16 infecciones simples, 7 *M. orale*, 4 *M. arginini*, 2 *M. hyorhinis* y 3 *M. fermentans*. De las 4 infecciones dobles halladas, la asociación más frecuente fue *M. arginini*, *M. hyorhinis* en tres muestras y *M. fermentans*, *M. salivarium* en un caso. La mitad de las 20 muestras positivas procedían de laboratorios externos y el resto de nuestro laboratorio. Se encontró un 100% de concordancia entre la técnica molecular (RFLP) y la técnica inmunológica (ELISA). Los laboratorios 1, 2 y 5 remitieron más de un cultivo celular, puede observarse que en cada uno de ellos se encontró la misma cepa infectando las células. (tabla 4)

Estandarización de un método de eliminación de diferentes especies de micoplasmas que infectan cultivos celulares.

Ensayo de citotoxicidad

En el ensayo para evaluar la citotoxicidad de AZM se observó que este antibiótico en concentraciones de 50 y 100 µg produjo alteraciones morfológicas y desprendimiento progresivo de la monocapa hacia el final del tratamiento en 3 líneas celulares. Luego del primer repique, en células HEp-2 se observó pérdida de los límites intercelulares con posterior redondeamiento y en RD un evidente alargamiento celular. En Vero se observaron vacuolas y desprendimiento celular a las 48 hs del comienzo del tratamiento, y posteriormente cambios en la forma. (fig 14, 15 y 16). El uso de 30 µg de AZM, no provocó variaciones considerables en el crecimiento o la morfología celular (tabla 5).

MIN alteró la morfología sólo en células RD (fig 17) y Vero, en las que se observó alargamiento de las células en las concentraciones de 10 y 20 µg /ml luego del primer repique. En el resto de las líneas no se

observaron cambios morfológicos. El uso de 5 µg/ml provocó una disminución del crecimiento en todas las líneas celulares (tabla 6).

La toxicidad de TIL se manifestó desde el primer día de tratamiento, provocando muerte celular en HEp-2 y RD en todas las concentraciones ensayadas (figs. 17 y 20). En células LLC-MK2 (fig 18) y Vero se observó puntillado y muerte celular a partir de 150 µg /ml. En las células MDCK provocó muerte celular a partir de los 200 µg/ml (fig 19). El crecimiento de LLC-MK2 y Vero en concentraciones de 125 µg /ml y de MDCK hasta 150 µg /ml no se vio afectado. (tabla 7)

Los resultados de viabilidad (%) y cambios morfológicos al final del ensayo de citotoxicidad se muestran en las tablas 5, 6 y 7. Las celdas coloreadas indican las concentraciones consideradas citotóxicas para cada línea celular. En las figuras (16, 17, 18,19 y 20) se muestran los cambios morfológicos (CM) observados.

Tabla 5: Viabilidad (%) y cambios morfológicos vs. dosis de AZM

Línea \ AZM ug/m	Viabilidad (%)				
	10	20	30	50	100
HEp-2	100	100	98	CM	CM ⁽¹⁾
LLC-MK2	100	70	58	52	46
MDCK	100	82	65	47	35
RD	100	100	97	CM	CM ⁽²⁾
Vero	100	100	87	CM	CM ⁽³⁾

⁽¹⁾Ver figura 14 ⁽²⁾ Ver figura 15 ⁽³⁾ Ver figura 16

Fig. 14: HEp-2 en fresco. A: Control. B: AZM 100 $\mu\text{g/ml}$. Magnificación 100X. Se observa redondeamiento, desprendimiento y muerte celular

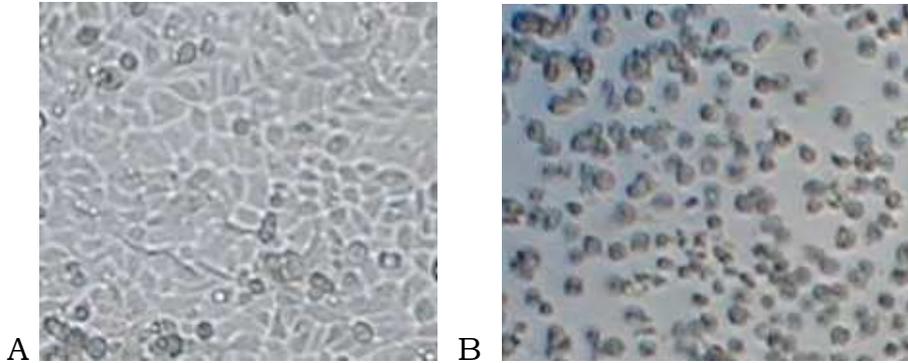


Fig. 15: RD, tinción con cristal violeta. A: Control. Magnificación 100X. B: AZM 100 $\mu\text{g/ml}$. Magnificación 100X. Se observa pérdida de la adhesión celular, alargamiento y aumento del volumen celular

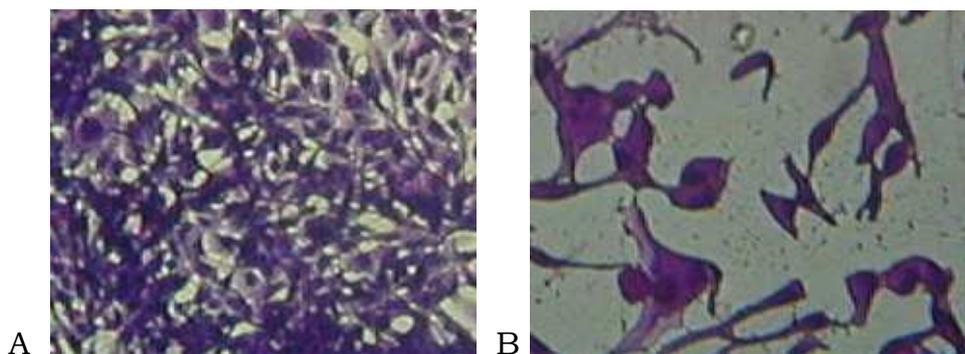


Fig. 16: Vero, tinción con cristal violeta. A: control. B: AZM 100 $\mu\text{g/ml}$. Magnificación 100X. Se observa desprendimiento de la monocapa y menor densidad celular.

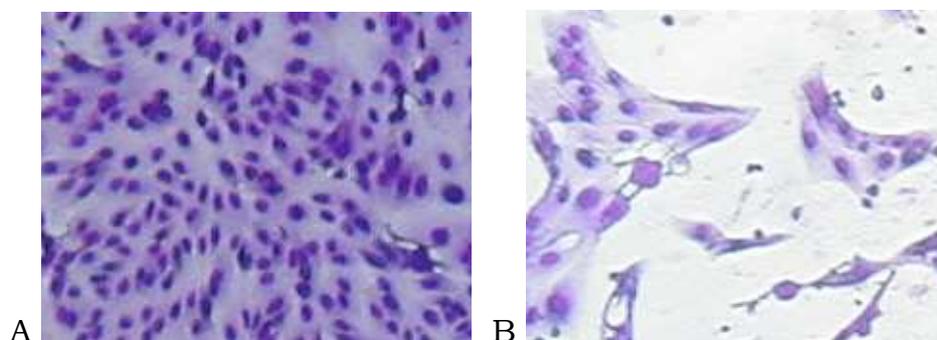


Tabla 6: MIN: Viabilidad (%)y cambios morfológicos vs dosis de MIN

	Viabilidad %		
MIN (µg/ml) Línea	5	10	20
HEp-2	70	65	46
LLC-MK2	70	60	36
MDCK	78	53	52
RD	84	CM ⁽⁴⁾	CM ⁽⁵⁾
Vero	65	CM	CM

(4) (5) Ver fig. 17

Fig. 17: RD, tinción con cristal violeta. A: control B: 10 µg/ml MIN. C: 20 µg/ml. Magnificación 100X. Se observa disminución del crecimiento y aparición de células alargadas

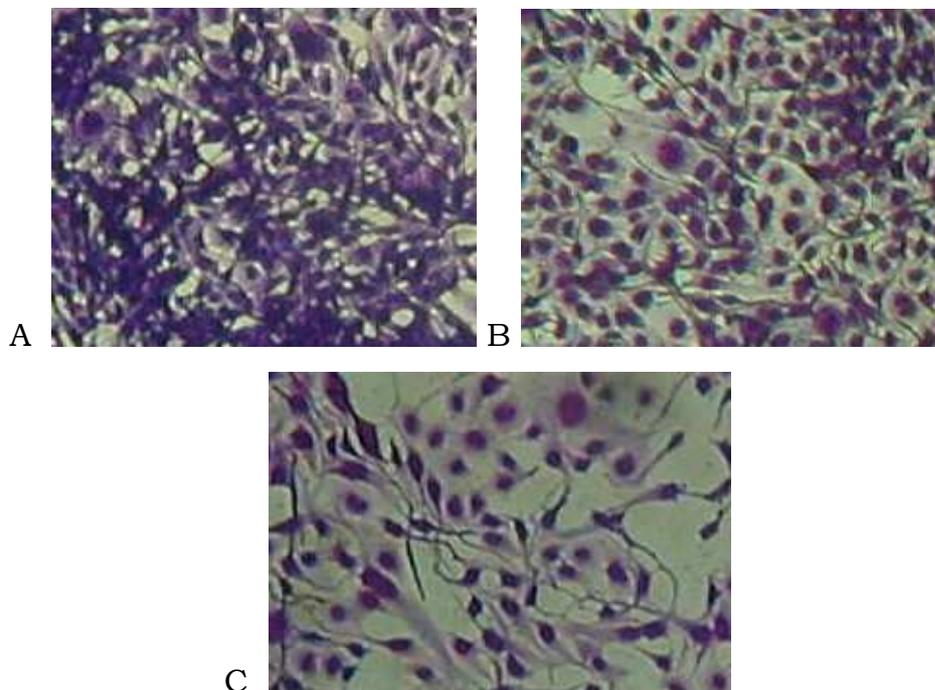


Tabla 7: TIL: Viabilidad (%) y cambios morfológicos vs dosis de TIL

TIL ug/m Línea	Viabilidad %				
	100	125	150	200	250
Hep-2	CM	CM	CM ⁽⁶⁾	CM	CM
LLC-MK2	100	100	CM	CM ⁽⁷⁾	CM
MDCK	100	100	99	CM	CM ⁽⁸⁾
RD	CM ⁽⁹⁾	CM	CM	CM	CM
Vero	100	90	CM	CM	CM

⁽⁶⁾ Ver figura 18 ⁽⁷⁾ Ver figura 19 ⁽⁸⁾ Ver figura 20 ⁽⁹⁾ Ver figura 21

Fig. 18: HEp-2, tinción con cristal violeta. A. Control celular. B: con TIL 150 µg/ml. Magnificación: 100X. Se observa redoneamiento y muerte celular.

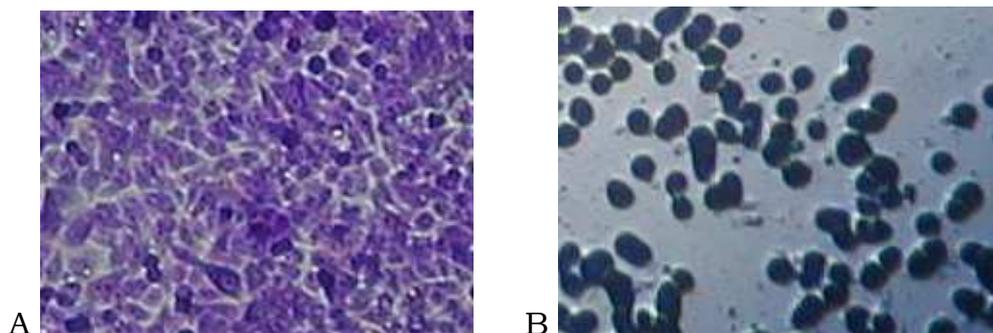


Fig. 19: LLC-MK2, tinción con cristal violeta. A: Control celular. B: con 200µg/ml de TIL. Magnificación 100 X . Se observa redondeamiento y desprendimiento de la monocapa.

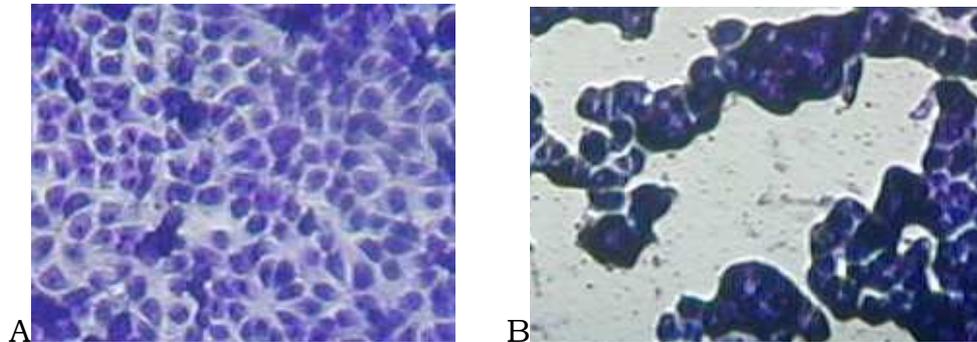


Fig. 20: MDCK, tinción con cristal violeta. A Control celular. B: con TIL 250 µg/ml. Magnificación 100X. Se observa redondeamiento y muerte celular.

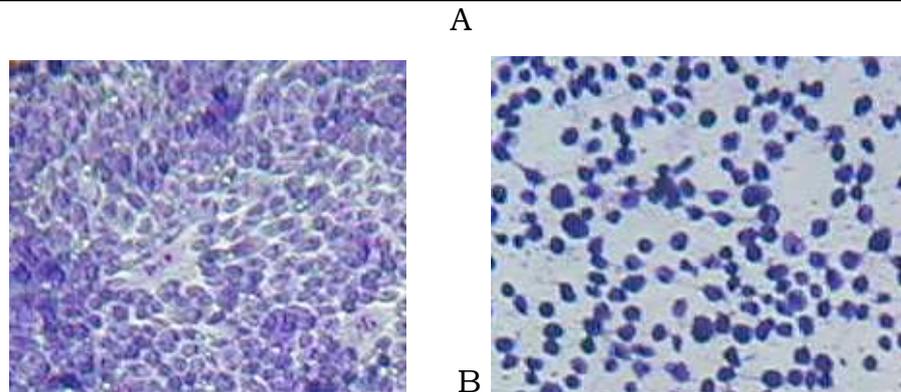
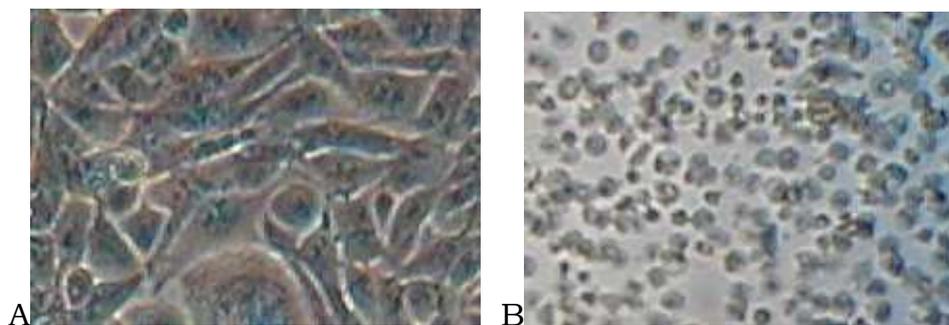


Fig. 21: Rd, en fresco, A:Control celular. Contraste de fase Magnificación 400X B: con TIL 100 µg/ml. Magnificación 100X



Las concentraciones elegidas para realizar los tratamientos fueron 30µg/ml (tabla 5) de AZM y 5 µg/ml (tabla 6) de MIN, ya que no producen cambios morfológicos en ninguna de las líneas ensayadas y la viabilidad es mayor al 65%.

La concentración de TIL elegida fue de 125 µg/ml en las líneas que no se vieron afectadas.

Tratamiento de células con infección leve Hoescht (+---)

En la tabla 8 se muestran los resultados luego de dos semanas de tratamiento de las células Vero infectadas con *M. orale* (H+---).

Tabla 8: Resultados de los tratamientos ATB testeados por H y PCR

Ensayo	AZM (30 µg/ /ml)	MIN (5 µg/ /ml)	TIL (125 µg/ /ml)
Höesch	negativo	negativo	positivo
PCR	positivo	negativo	No realizado

Luego del tratamiento con TIL, la coloración de H dio positiva, demostrando que la infección no fue eliminada, por lo cual no se realizó PCR.

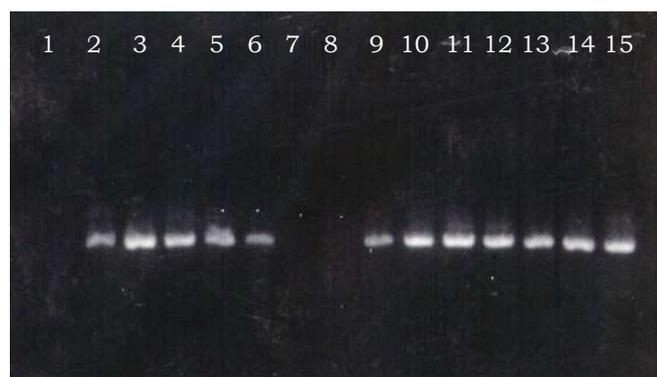
Utilizando 30 µg/ml AZM, el H fue negativo a los 15 días, mientras que por PCR se obtuvo un resultado positivo, evidenciando que el tratamiento no fue efectivo.

El tratamiento con 5 µg/ml de MIN eliminó la infección. Los ensayos de H y PCR fueron negativos desde los diez días de tratamiento. Estos resultados indican que el tratamiento más adecuado es el realizado con este ATB. Se decidió realizar 3 repiques durante 10 días con MIN

5ug/ml. En la figura 21 se observan los resultados de la reacción de PCR durante los tratamientos de MIN y AZM.

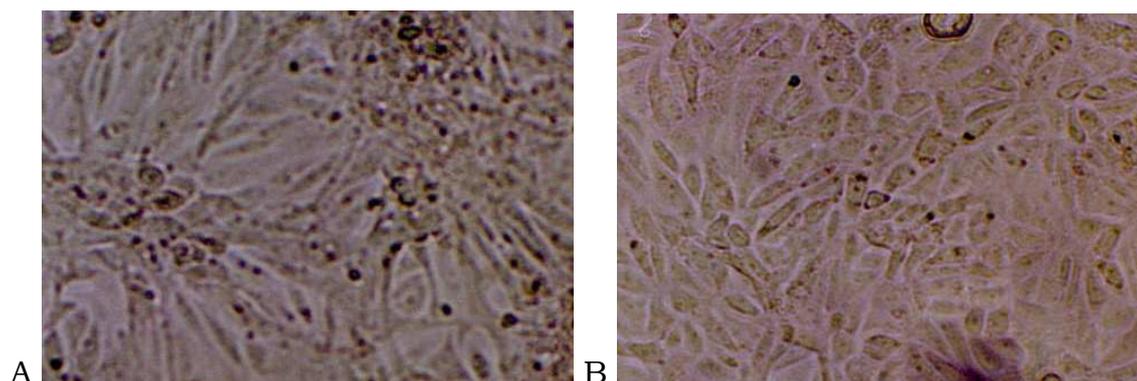
Fig. 21: Monitoreo por PCR durante los tratamientos ATB

CALLE	TRATAM	DIAS	RESULTADO
1	SIN ATB	-	Control neg.
2		0	Control pos
3		7	Control pos
4		10	Control pos
5	MIN	0	POS
6		7	POS
7		10	NEG
8		15	NEG
9	AZM	0	POS
10		7	POS
11		10	POS
12		15	POS
13		0	control pos
14		7	control pos
15		10	control pos



Cuando se utilizó el tratamiento elegido, 5 µg/ml de MIN, durante diez días, en células con mayor grado de infección, los resultados mostraron que eliminó la infección en las líneas LLC-MK2 (++--), Mc Coy (+++-), B95a (+---) y Vero (++++). Las células Vero infectadas mostraban alteraciones morfológicas tales como alargamiento y presencia de puntillado celular. (fig. 22 A) Luego del tratamiento con MIN y de corroborar la eliminación de micoplasmas por H, EIA y PCR, las células recuperaron su morfología epitelial característica (fig. 22 B)

Fig. 22: A: células Vero (H++++) infectadas con *M. orale* B: Reversión a la morfología normal luego del tratamiento ATB. Fresco. Magnificación 200 X



Luego del tratamiento ATB, ninguna línea celular evidenció contaminación de acuerdo a los resultados obtenidos por H y PCR durante 3 meses.

Las cepas de micoplasmas eliminadas fueron *M. orale*, *M. hyorhinis* y *M. arginini*.

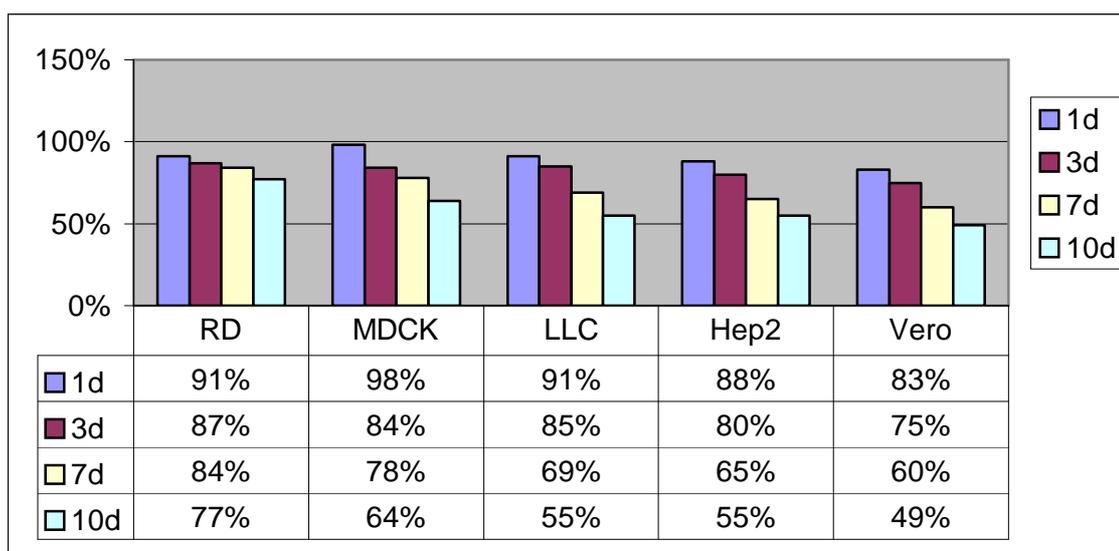
Efecto del tratamiento

Efecto del tratamiento sobre la tasa de crecimiento

El efecto del tratamiento con 5 µg/ml de MIN sobre la tasa de crecimiento se evaluó a distintos tiempos sobre diferentes líneas celulares. Se observó una disminución en la tasa de crecimiento en todas las líneas celulares estudiadas hacia el final del tratamiento.

En la figura 23 se muestran las tasas de crecimiento de cada línea celular a las 24 horas, 3, 7 y 10 días de tratamiento. A partir del tercer día, se comienza a evidenciar un mayor efecto sobre células Vero. Al séptimo día, LLC-MK2, Hep-2 y Vero disminuyeron la tasa de crecimiento a valores entre el 60-69%. Al décimo día, las tasas variaron entre el 50 y 64%, excepto para RD, que se mantuvo 7 puntos por debajo del valor anterior.

Fig. 23: Tasas de crecimiento (%) vs tiempo de tratamiento (d)



Efecto sobre la sensibilidad celular a la infección viral:

Para evaluar la sensibilidad de las células a la infección viral luego del tratamiento ATB, las células se infectaron con virus sarampión y los títulos obtenidos se compararon con los obtenidos en la misma línea celular no infectada ni sometida al tratamiento. Los títulos obtenidos en células Vero tratadas y no tratadas se muestran en la tabla 10. Los títulos no presentaron diferencias por lo que se deduce que la sensibilidad de la células Vero a la infección por sarampión no se vio afectada por el tratamiento ATB.

Tabla 10: Títulos de la cepa vacunal de sarampión .

	Placa 1	Vero	Vero tratadas
Títulos obtenidos	Sd1	3,950	3,825
	Sd2	3,825	3,825
	Sd3	3,741	3,825

	Placa 2	Vero	Vero tratadas
Títulos obtenidos	Sd1	3,700	3,950
	Sd2	4,075	3,325
	sd3	3,950	4,075

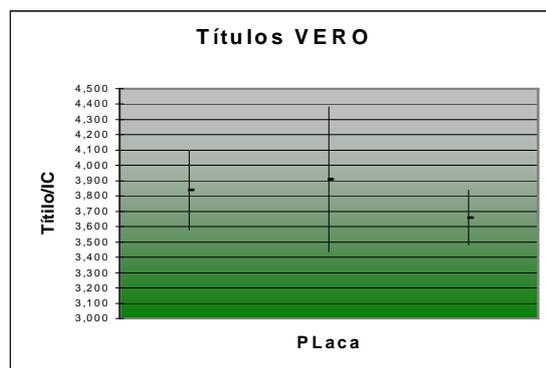
	Placa 3	Vero	Vero tratadas
Títulos obtenidos	Sd1	3,575	3,700
	Sd2	3,700	3,700
	Sd3	3,700	3,825

Sd1, Sd2,Sd3: serie de dilución 1, 2 y3

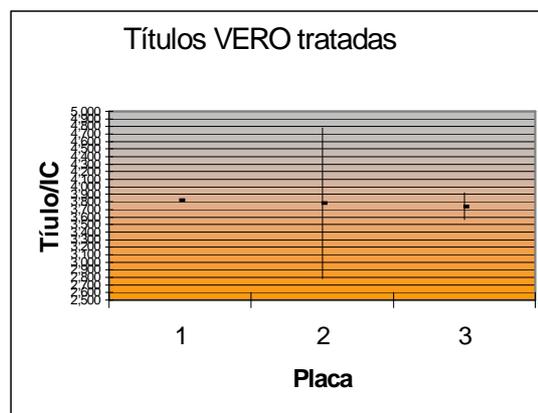
Análisis estadístico:

Los coeficientes de variación (CV) de los títulos obtenidos en la tabla 10 resultaron menores al 10%. Para cualquier producto biológico se acepta hasta un 20% de variación (Centro Nacional de Control de Biológicos). Según la prueba t de student no hay diferencias entre los valores medios de los títulos obtenidos en ambos cultivos en cada placa, con un nivel de confianza del 5%. Según el análisis de varianza para un factor (ANVA), no existen diferencias de sensibilidad entre las células Vero y Vero tratadas. Aplicando ANVA para 2 factores se concluyó que el título de la vacuna de sarampión no es afectado por el uso de Vero tratadas y que no existe variación en los títulos entre placas (p mayor de 0.05)

Títulos obtenidos con Vero
(intervalo de confianza de 95%)



Títulos obtenidos con Vero tratadas
(intervalo de confianza de 95%)



Discusión

Los métodos de detección de micoplasmas con coloraciones intercalantes en la doble hélice de DNA, son ampliamente utilizados debido a la sencillez de la técnica y rapidez en los resultados. La coloración puede realizarse directamente sobre la línea celular en estudio o en forma indirecta, utilizando una línea indicadora, generalmente células Vero. Para este ensayo, se inocula el sobrenadante de las células posiblemente infectadas sobre la línea celular indicadora, se incuba durante 7 días y luego se realiza la tinción (Uphoff, 1992). La desventaja de la coloración directa es que algunas líneas presentan un fondo citoplasmático inespecífico que interfiere en la lectura de los resultados. Este inconveniente se evita en el método indirecto cuando se usan células, como las Vero, que no presentan afinidad inespecífica por el colorante. La mayor desventaja de este método, es que requiere una semana de cultivo durante la cual se amplifica el inóculo y se aumenta la probabilidad de contaminar otras líneas. En nuestro laboratorio preferimos utilizar el método directo considerando que la manipulación de los cultivos infectados es menor, el porcentaje de resultados dudosos no es elevado y el resultado puede leerse a las 24 horas. Por otra parte, la observación de la fluorescencia cuenta con un grado de subjetividad del observador, especialmente en muestras con infecciones leves. En nuestro laboratorio, para uniformar el criterio de lectura, la observación al microscopio la realiza siempre el mismo operador.

Si comparamos los resultados del análisis de las muestras por los métodos de Hoescht y PCR, de las 74 muestras analizadas por estos dos métodos, los resultados positivos fueron concordantes en 12/18 (67%) muestras y en 54/56 (96%) muestras negativas. Dos muestras dudosas

por Hoescht fueron negativas por PCR. Dos muestras dudosas y cuatro muestras negativas por Hoescht fueron positivas por PCR, confirmadas como verdaderas positivas por ELISA y/o RFLP. Estos resultados demuestran que la técnica de PCR, por su alta sensibilidad, es muy eficiente para detectar infecciones leves, cuando la coloración de Hoescht da negativa o dudosa y, por lo tanto, es la técnica indicada para evaluar la eficacia de tratamientos antimicoplasmas. Un claro ejemplo de esto es el caso del tratamiento descrito con AZM, en el que se disminuyó la concentración de micoplasmas a niveles no detectables por Hoescht, sin embargo la PCR se mantuvo positiva durante todo el ensayo.

El kit de ELISA para tipificar la infección en líneas celulares, da resultados 100% concordantes con RFLP para las cuatro cepas cuyos anticuerpos están incluidos en el equipo. No se encontraron reacciones cruzadas con *M. fermentans* y *M. salivarium* cuyos anticuerpos no se encuentran en el kit de enzimoimmunoensayo. Estas cepas, sin embargo, circulan entre laboratorios de nuestro país (Pérez, 2000), por lo que se debería considerar la probabilidad de un resultado falso negativo si se utiliza solamente este kit de ELISA.

En un estudio previo que analizó células de distintos laboratorios de nuestro país, (Coronato, 1991) se encontró un 70% de cultivos infectados. Nuestros resultados muestran que solo el 18% de las líneas celulares analizadas estaban contaminadas. En nuestro laboratorio, en un estudio retrospectivo de control de calidad de las líneas que se mantienen de rutina, se encontró que se había reducido la frecuencia de contaminación del 70% al 30% en el período 1991-1995 y llegó al 0% en el último chequeo realizado (Lewis, 2001).

La disminución de la tasa de contaminación por micoplasmas se debió principalmente a 3 factores fundamentales: buenas prácticas de asepsia, mayor frecuencia en el control de micoplasmas y mejoras en el laboratorio como fue la adquisición de otro flujo laminar y reformas edilicias tendientes a separar las áreas de trabajo.

En esta tesis se estudiaron muestras de cultivos enviados por laboratorios externos y líneas celulares de nuestro laboratorio para determinar la presencia o no de contaminación por Micoplasmas. El 18% (20/110) de las muestras analizadas fueron positivas, 10 de laboratorios externos y 10 del nuestro. Seis de las 10 muestras positivas halladas en nuestro laboratorio estaban congeladas en nitrógeno líquido desde años anteriores a que se realizara el control periódico de micoplasmas y 4 (4/10) se detectaron durante los controles de rutina. El resto fueron cultivos que generalmente son enviados a nuestro servicio para ser controlados para micoplasma.

Coronato y colaboradores (1991) postulan que el operador es la fuente más frecuente de contaminación ya que la mayoría de las cepas correspondieron a *M. orale*. En este trabajo hallamos 16 infecciones simples: 7 *M. orale*, 4 *M. arginini*, 2 *M. hyorhinitis* y 2 *M. fermentans*, tres infecciones dobles por *M. arginini*, *M. hyorhinitis*, en líneas dependientes de anclaje y un caso de asociación *M. fermentans*, *M. salivarium*, en una línea en suspensión. Analizando las siete infecciones con *M. orale*, 2 líneas celulares resultaron positivas durante el control de rutina; hasta ese momento habían sido negativas por H y PCR. En base a la tipificación, se concluyó que habían sido infectadas a partir de células Vero en que se estaban ensayando los tratamientos antibióticos. En este caso, se identificó la fuente de infección y además, se pudo relacionar con las condiciones de trabajo, dado que debido a reformas

edilicias no podía trabajarse con las prácticas habituales en flujos laminares separados o con los intervalos de tiempo adecuados. Uno de los cultivos estaba congelado en nuestro laboratorio desde años anteriores, tres provenían de otros laboratorios del país y uno de un laboratorio de referencia de EEUU. Anteriormente la prevalencia de *M. orale* estaba asociada al operador; en la actualidad existe mayor información acerca de la infección por micoplasmas y además, los requerimientos de calidad para la utilización de cultivos celulares, propiciaron el uso de buenas prácticas de laboratorio. De acuerdo a nuestros resultados, la principal fuente actual de diseminación de *M. orale* serían cultivos infectados no controlados.

Se encontraron 3 líneas celulares infectadas con *M. arginini* y *M. hyorhinis*, de origen bovino y porcino, respectivamente. El suero bovino utilizado como suplemento podría haber sido fuente de contaminación de estas 2 especies. *M. hyorhinis* contaminaría el suero durante el proceso de extracción en los mataderos donde se faenan conjuntamente bovinos y porcinos, ya que no hay reportes de detección de micoplasmas en la tripsina de páncreas de cerdo. (Timenetsky, 1998). Considerando que los reactivos para cultivo celular utilizados en la actualidad son controlados para micoplasmas por el fabricante (Life Technologies, 2001; HyClon, 2000, Sigma, 2001), la fuente más probable de estas infecciones son los cultivos no controlados que circulan por intercambio entre laboratorios. La tipificación de las cepas de micoplasmas resultó útil en cuanto a la posibilidad de identificar la ruta de infección en el laboratorio.

Respecto de los tratamientos con ATB, la utilización de TIL no resultó práctica por la diversidad de efectos tóxicos, ni eficaz para la eliminación definitiva de la contaminación.

Se decidió evaluar AZM porque es un ATB ampliamente utilizado en niños con cuadro de neumonía atípica por *M. pneumoniae* (Mandell G1, 1995). A las concentraciones ensayadas disminuyó el nivel de infección de manera que no se pudo detectar por Hoescht, pero no la eliminó completamente, como se observó con el resultado de la PCR. No se pudo ensayar a mayores concentraciones debido a los cambios morfológicos que causaba en las células. Por lo tanto, a pesar de ser eficaz en su aplicación terapéutica, no demostró ser útil para el tratamiento *in vitro* de células infectadas.

El tratamiento con Minociclina en una concentración de 5µg/ml realizando tres repiques durante diez días, fue el de elección para eliminar micoplasmas. Este esquema resultó ser eficaz, breve y de fácil aplicación para diferentes líneas celulares. La toxicidad ejercida por MIN a esa concentración no afecta la morfología celular aunque se observa una disminución en la tasa de crecimiento. Las líneas Vero, HEp-2 y LLC- MK₂ son las que se vieron más afectadas en su tasa de crecimiento mientras que RD es la que menos efectos tóxicos presenta.

Para la eliminación de micoplasmas es necesario determinar previamente la dosis máxima no citotóxica de antibióticos a utilizar para evitar la aparición de resistencia por la utilización de bajas dosis (Eisenhart M;1964). La sensibilidad de cada línea celular varía respecto del ATB, del tiempo de tratamiento y de las dosis utilizadas. Por lo tanto, no se puede estandarizar un método único para eliminar micoplasmas que sea efectivo y no citotóxico para cualquier línea celular.

Se trató en un principio la línea levemente infectada (Vero +---) con los distintos antibióticos porque se estableció que primero debía eliminar

una infección leve para luego probar los antibióticos efectivos en líneas con otros grados de infección. A pesar de que Vero fue una de las células más afectadas por el antibiótico, el tratamiento con MIN no afectó su sensibilidad a la infección por el virus de sarampión, por lo cual esta línea tratada puede seguir utilizándose en ensayos de titulación viral, aunque es importante tener en cuenta que la respuesta depende de cada sistema virus-célula.

En conclusión, considerando indispensable la ausencia de micoplasmas para garantizar la calidad de líneas celulares y productos biológicos relacionados, recomendamos utilizar medidas de prevención, control y tratamiento.

a) Como medidas de prevención reiteramos la necesidad de realizar buenas prácticas de laboratorio respetando la condiciones de la técnica aséptica, utilizar productos y reactivos controlados por el fabricante y considerar cualquier línea que llegue al laboratorio como probable fuente de infección, manteniéndola en cuarentena hasta que los resultados de los controles demuestren la ausencia de contaminación por cualquier microorganismo.

b) Respecto del control de micoplasmas, recomendamos la utilización de dos técnicas, tinción de Hoescht y PCR, de acuerdo a las facilidades del laboratorio. La utilización de la tinción de Hoescht, permite además visualizar cualquier contaminación incipiente por otro microorganismo y tiene menor costo que la PCR. Puede realizarse un screening quincenal de todas las líneas celulares con tinción de Hoescht, tomando además muestras de células y congelando para realizar PCR posteriormente, y un screening mensual o bimestral por PCR. En caso

de muestras positivas, hacer un análisis retrospectivo por PCR de las muestras almacenadas y una tipificación por RFLP. La detección temprana permite aislar y eliminar el cultivo infectado, la tipificación es útil para identificar la ruta de infección.

c) Como procedimiento general para la eliminación de micoplasmas recomendamos en primera instancia eliminar el cultivo infectado. En caso de ser imprescindible preservar la línea, utilizar un tratamiento antibiótico. El tratamiento que recomendamos es utilizar minociclina en una concentración de 5µg/ml realizando tres repiques durante diez días porque este esquema resultó ser eficaz, breve y de fácil aplicación para diferentes líneas celulares. Sin embargo, nuestra recomendación es que debe evaluarse la toxicidad del ATB en la dosis máxima no citotóxica antes de someter la línea infectada al tratamiento.

Abreviaturas

A: Acholeplasma

ANVA: análisis de varianza para un factor

ATB: antibiótico

ATCC: American Type Culture Collection

AZM: azitromicina

C: citoplasma

cc: control de células

CCID50: dosis infectiva 50 en cultivo celular

CM: cambios morfológicos

CT: Cultivo de Tejidos

CV: coeficiente de variación

d: días

D: dudoso

DAPI: 4', 6 diamidino 2 fenilindol dihidrocloruro

DMNC: Dosis máxima no citotóxica

DMSO: dimetilsulfóxido

EBV: virus Epstein Barr

ELISA: enzimoimmunoensayo de captura

FAL: fosfatasa alcalina

lab: laboratorio

M: micoplasmas

mc: monocapa

MC: medio de crecimiento

MEM: Medio Esencial Mínimo

MIN: minociclina

MM: medio de mantenimiento

µl: microlitro

N: núcleo

ND: no determinado

NIH AIDS Research Program: Programa de Investigación del Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos

nm: nanomoles

mM: micromoles

4-NPP: 4-nitrofenilfosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pb: pares de bases

PM: peso molecular

P/V: peso en volumen

V/V: volumen en volumen

pg: picogramo

RFLP: análisis de restricción enzimático

sd: serie de dilución

SFB: suero fetal bovino

sus: suspensión

TBE: Tris - Borato- EDTA

TIL: tilosina

U: Ureaplasma

BIBLIOGRAFÍA

Absher M (1974) Hemocytometer counter. Cap VIII. Evaluation of culture dynamics. En: Kruse & Patterson (eds). Tissue Culture. Methods and Applications, Academic Press, New York, 395-397.

Baum SG (1995) *Mycoplasma pneumoniae* and atypical pneumonia. En: Mandell GL, Bennett JE; Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. 1704-1712. Churchill – Livingstone, New York.

Casas, I; Powel, L; Klopper P; Cleator, G. (1995) New Method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction. J. Virol. Meth. 53: 25-36

Coronato, S ; Coto, C. (1991) Prevalencia de *Mycoplasma orale* como contaminante de los cultivos celulares en la Argentina. Revista Argentina de Microbiología. 23 :166-171

Coronato, S ; Coto, C. (1994) A simple Method to Eliminate Mycoplasmas from Cell Cultures. J. Virol. Methods. 46 : 85-94

Chen, T.R. (1977). In Situ Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Fluorescent Hoechst 33258. Exp. Cell. Res. 104 :255-262.

David Taylor – Robinson (1994) Mycoplasma and Ureaplasma. En: Bacteriology. cap 53 p652-662.

Del Giudice, R ; Tully, J ; Rose, D ; and Cole, R. (1985) Mycoplasma pirum sp. Nov., a terminal structured mollicute from cell cultures. Int. J. Syst. Bacteriol. 35 : 285-291

Doane, Frances and Nam Anderson. 1980. Screening Cell Cultures for Adventitious Agents, en Electron Microscopy in Diagnostic Virology cap 5 p 39-42

Dmochowsky, L et al (1967) Studies on the submicroscopic morphology of structures resembling Mycoplasma and virus particles in mice and men. Ann N.Y. Ac. Sci. 143 : 578-607

Drussurget, O; Roulland-Dussoix, D. (1994). Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera.

Appl Environ Microbiol Mar 60:953-9.

Dybving, K and Voelker, L. (1996) Molecular Biology of Mycoplasmas. Ann. Rev. Microbiol. 50 : 25-57

Fogh, J and Fogh, H. (1967) Irreversibility of Major Chromosome Changes in a Mycoplasma Modified Line of Human Amnion Cells. Proc. Of the Society for the experimental Biol and Med. 126 : 67-74

Fleckestein, E; Uphoff, CC; Drexler, HG (1994) Effective treatment of mycoplasma contamination in cell lines with enrofloxacin (Baytril). Leukemia, 1994 Aug 8:1424-34

Freiberg, E ; Masover, G. 1990. Mycoplasma Detection in Cell Culture by concomitant Use of Bisbenzamide and fluoresceinated Antibody. In vitro cell Dev. Biol. 26: 585- 588.

Gabridge Michael and Daniel J. Lundin. 1989. Cell Culture User's Guide to Mycoplasma Detection & Control. Bionique Testing Laboratories, Inc.

Girardi, A ; Hamparian, V ; Somerson, L. (1965) Mycoplasma Isolates form Primary Cell Cultures and Human Diploid Cell Strains. Proc. Soc. Esp. Biol and Med. 120 : 760-771

¹Harasawa, R. Et al. 1993. Sensitive detection of Mycoplasma in cell cultures by using two step polymerase chain reaction. In: Kahane, I. Aoni, AS. Eds. Rapid diagnosis of mycoplasmas. New York. Plennun Press

Harasawa , R ; Mizusawa, H ; Nozawa, K . et al. (1993) Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. Res. Microbiol. 144 :489-493

Hart, Kate; Del Giudice, Richard; Korch, W. (2001) Absence of Mycoplasma Contamination in the Anthrax vaccine. Emerging Infect. Dis. 8: 94-96.

Hay, R. J. ATCC Quality Control Methods for Cell Lines. Rockville. MD. 1995 :12

Hay, R; Macy, ML ; and Chen, T. (1989) Mycoplasma infection of cultured cells. Nature. 339 : 487-488

Hemler, M ; Strominger, J . (1982) Monoclonal antibodies reacting with immunogenic mycoplasma proteins present in human hematopoietic cell lines. *The Journal of Immunol.* 129 ; 6 :2734-2738

Hu, M ; Buck, C. (1993) Detection of mycoplasma contamination in viral stocks by a polymerase chain reaction technique. *J. Tiss. Cult. Meth.* 15 :155-160.

Hu, M ; Buck, C ; Jacobs, D ; Paulino, G ; Khouri, H. (1995) Application of PCR products and identification of mycoplasma contamination in virus stocks. *In Vitro Cell. Dev.* 31 : 710-715.

Hy Clone. (2002) *Animal Sera en Reference Catalog.* P 17-20

Jeanson, S; Brosson, J. Elimination of mycoplasmas from cell cultures utilizing hyperimmune sera. *Exp Cell Res* 1985 Nov 161:181-8

Jones, T; Minic, R; Yang, L (1997) Attachment and ingestion of mycoplasmas by mouse macrophages. II. Scanning electron microscopic observations. *Am J Pathol* 1977 May 87:347-58

Katzeni, V; Gilroy, B; Ryait, K; Arishoshi, P; Bieniatz, J; weber, N; Taylor-Robinson. (1993) Mycoplasmas fermentans in individuals seropositive and seronegative for HIV-1. *Lancet* 341:271-273.

Kirchov, H and Schmidt, R. (1995) *Biochemica* 1 : 33-36

Kovacic, R; Launay, V; Tuppin, F; Lafeuillade, A; Feullie, V; Montagnier, L; Grau, O. Searching for the presence of six Mycoplasma species in Peripheral Mononuclear Cells of Subjects Seropositive and Seronegative for Human Immunodeficiency Virus. *J. Clin. Microbiol.* 1808-1810

Levine, E ; Thomas, L ; Mc Gregor, D ; Hayflick, L, Eagle, H. (1968) Altered nucleic acid metabolism in human cell cultures infected with mycoplasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60 : 583-589

Lewis A, Landreau F, Francalancia V, Pérez C, Tous M (2001) Infección por micoplasmas en cultivos celulares. Efectos del control sobre la incidencia” IX Congreso Argentino de Microbiología, Resumen P287, pag 121, Buenos Aires, Argentina

Life Technologies (2001) *Animal Sera. Microbiological Test*, en *Gibco BRL Products & Reference Guide.* 4-3

Lo, S; Wear, J; Gree, P; Jones, P; Legier, F. (1993). Adult respiratory distress syndrome with or without systemic disease associated with infections due to *Mycoplasma fermentans*. Clin. Infect. Dis. (S1) 243-249

Manual del workshop : Cell Lines and Híbridomas (1997). Sección I. Mycoplasma and Mycoplasma Infection in Cell Culture. American Type Culture Collection.

Mc Garrity, GL and Kotani, H. (1985) Cell Culture mycoplasma. En S. Razin and Barile, eds The Mycoplasmas vol 4. Academic Press, Nypag353-390

¹McGarrity, G ; Sarana, and Vanaman, V. (1985) Cell Cultures Techniques, ASM News 51 : (4) 170-183

McGarryti, G ; Vanaman, J ; and Sarana. (1984) Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures : a Review. In Vitro. 16 : 346-356.

Mc Garrity G ; Kotani, H ; Buttler, G. (1992) Mycoplasmas and tissue culture cells. En : Mycoplasmas : Molecular Biology and Pathogenesis. Eds. : Maniloff, J. Academic Press, ASM. Washington, DC. 445-454

Nicholson GL; Nicholson, N; M. Nass (2000) Anthrax Vaccine: controversy over safety and efficacy. Ant. and Infect Dis. Newsletter 18:1-6

Pérez, C; Landreau F; Francalancia V; Tous M; Lewis A. 2000 Identification of mycoplasma: finding out transmission routes. Virus Reviews and Research S1 p56

Pollok, E ; Kenny, E (1963) Proc. Soc. Esp. Biol. Med 112 ; 176-177

Phillips HJ (1972) Dye Exclusion Tests for Cell Viability. Cap VIII. Evaluation of culture dynamics. En: Kruse & Patterson (eds) Tissue Culture. Methods and Applications, Academic Press, New York, 406-407.

Razin Shmuel, Yogev D, and Naot Y 1998 Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62, No. 41094-1156

Reed, LJ, and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 27: 493-497.

Rodwell, A (1967) The Nutrition and Metabolism of Mycoplasma : Progress and Problems Ann of the New York Academy of Science 143 : 88-109

Sambrook, J ; Maniatis, T Frisch, E, eds (1989) . Gel electrophoresis of DNA. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd. Ed.: 6.9-6.15, 6.19.

Saillard, C; Carle, P; Bove, J; Bebear, C; Lo, S (1990) Genetic and serologic relatedness between Mycoplasma fermentans strains and a mycoplasma recently identified in tissues of AIDS and non AIDS patients. Res. Virol; 141: 385-95

Sigma. 2002 Classic Media Supplements. Serum and serum replacements en: Productos de investigación en Ciencias de la Vida. Pag 442.

Singer, S ; Barile, M ; Kirschstein, R. (1973) Mixed mycoplasma virus infection in cell cultures. Ann. N. Y. Acad. Sci. 225-304-310

Smith, P. (1960) Amino Acid Metabolism of PPLO . Ann. N.Y. Acad. Sci. 79 : 543-550

Standbridge, E ; Hayflick, L ; Perkins, F. (1971) Modification of amino acid concentrations induced by mycoplasmas in cell culture medium . Nature New Biol. 232 : 242-244

Timenetski, Jorge. (1998) Mycoplasma infection in cell cultures. Virus Reviews & Research. 34-49.

Tully, J. and R. F. Withcomb (ed). (1979) *The Mycoplasmas* vol2 Academic Press inc. New York.

Tully, J; (1993) Current status of the mollicute flora of humans. Clin. Infect. Dis. 17 S1: 2-9

Tully, J. (1996). Diagnosis of Mycoplasma infection of cell cultures : Introductory remarks. En : Razin, S. & Tully, J. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma. Academic Press. Vol. 2. P. 407-410

Schmidt, Jörg and Volker Efle. (1984) Elimination of Mycoplasma from cell Cultures and Establishment of Mycoplasma free Cell Lines.

Uphoff, C; Brauer, S; Grunike, D; Gignac, S; Roderick, A; McLeod, F; Quentmayer, H; Steube, K; Tummler, M; Voges, M; Wagner, B; Dreixer,

H. (1992) Sensivity and Specify of five Different Mycoplasma Detection Assays. *Leukemia*. 6 ; 4 : 335-341.132

Vennegoor, A ; Polak-Vogelzang, A ; Hekman, A. (1982) Monoclonal antibodies against Mycoplasma hyorhinis. A secondary effect of immunization with cultured cells. *Exp. Cell Res.* 137 : 89-94

Visser, I; ter Laak, E; Jansen, H (1999) Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate Mycoplasma bovis in artificially infected frozen bovine semen.. *Theriogenology* 51:689-97

Quinnan, Gerald .1993 (activo enero2002) Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>

ICH Guidance on Quality of Biotechnological/Biological Products: Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. 1998. *Federal Register*. Vol 63; 182: 50244-249

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar quiero expresar mi mas profundo agradecimiento a la persona que me guió en este arte - ciencia que son los cultivos celulares. Me ayudó constante e incondicionalmente en todas las etapas de esta maestría, colaboró con la escritura de la tesis, corrigiendo gramática y ortografía, alcanzándome referencias bibliográficas que sustentaban el diseño experimental y los resultados encontrados. Me brindó contención y aliento cuando se presentaron dificultades, analizó con el espíritu crítico que la caracteriza el trabajo realizado haciendo oportunas observaciones metodológicas. Por todo esto, a Mónica Tous, gracias, gracias, mil gracias!

También quiero agradecer a...

mis compañeros del Servicio cultivo de Tejidos: Adrián Lewis, Fernando Landreau, Verónica Francalancia y Fabián Pardón por su participación y colaboración.

Dolores Fellner, con quien incursioné en las pruebas y los cálculos de sensibilidad de métodos moleculares.

Alejandra Picconi y todo el Servicio de Virus Oncogénicos que prestaron incondicionalmente el equipamiento y su laboratorio en la mayoría de los experimentos.

Jerónimo Cello, que guió este trabajo.

Marta Mazza, del Centro Nacional de Control de Biológicos, por su dedicación y orientación en el análisis estadístico.

Andrea Torres y Mirla Lucero del Centro Nacional de Control de Biológicos, que se ocuparon de suministrarme la cepa vacunal de sarampión y la cámara de cultivo donde realicé las titulaciones virales.

Mariana Fernández Cobo que tuvo la amabilidad de comprar en el exterior las cepas de micoplasmas utilizadas en este trabajo.

Mirta Carlomagno que aportó desinteresadamente su experiencia en la redacción de esta tesis.

Mabel Manca, socio-gerente de Sigma - Aldrich Argentina SA, por la provisión de la cámara fotográfica con la que se obtuvieron las imágenes de esta tesis.

la Asociación Cooperadora por el apoyo que constantemente brinda a la investigación.

la ANLIS "Dr. C. G. Malbrán", que me permitió realizar esta Maestría.

Y por último pido disculpas a mis hijas, Sofía y Bianca ; y a mi esposo Oscar por los momentos que dejé de compartir con ellos mientras estaba realizando esta Tesis.