

Universidad ORT
Facultad de Ingeniería

**Puesta a punto de una herramienta
molecular para la detección de
Mycoplasma spp. en líneas celulares y
cepas virales.**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología.

Sabine de León – 195767

Tutora: Lucía Fiestas

Co-tutora: Viviana Sánchez Martins

2018

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, Sabine de León, declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Trabajo Final de Carrera;
- Cuando he consultado el trabajo de otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Sabine de León

Montevideo, 01 de marzo de 2018.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la empresa Virbac Uruguay y sus colaboradores, por la confianza y la oportunidad que me dieron para poder desarrollar este trabajo, el cual me ayudó y me continúa ayudando día a día a crecer profesionalmente.

A la universidad ORT, su Laboratorio de Biotecnología de primer nivel, sus profesores y coordinadores por la formación que me fue dada y por el apoyo constante durante el transcurso de la carrera y de este trabajo.

Por otro parte agradezco al CII y a la ANII por el voto de confianza en el trabajo así como el financiamiento brindado.

Agradezco a mis tutoras Lucía Fiestas y Viviana Sánchez, por la ayuda, la buena disposición, la guía y las enseñanzas que me brindaron durante todo este año de trabajo.

A los compañeros de trabajo de los diferentes departamentos de Virbac Uruguay por hacerme sentir parte del equipo desde el primer día y por la buena disposición.

A mis amigos por estar siempre y apoyarme en cada etapa de la carrera así como del trabajo final.

A toda mi familia, en especial a mis padres Murielle Gras y Juan Pablo de León por apoyarme en la elección de esta carrera y creer en mí. Y finalmente a Diego, Tequila, Luna y el poroto por soportar mis locuras y por el apoyo incondicional especialmente en los momentos finales del trabajo.

RESUMEN

Mycoplasma es un género de bacterias, muy pequeñas, parásitas, cuya principal característica es la falta de pared celular. Debido a esto logran infectar cultivos celulares y virales sorteando las barreras típicamente utilizadas en los laboratorios de biotecnología (filtraciones de medios por 0.22 µm, observación al microscopio diaria, controles de esterilidad microbiológicos). Es por esto que la contaminación con *Mycoplasma* en sobrenadantes celulares y cepas virales es un problema de suma importancia, el cual toma cada día más relevancia. A pesar de su pequeño tamaño son causantes de efectos de alto impacto en los cultivos, como alteraciones en la síntesis de proteínas, ADN y ARN, alteración del crecimiento celular y pueden llegar a generar degeneración y pérdida total del cultivo. Las diferentes normativas internacionales vigentes tales como el *Code of Federal Regulations*, la Farmacopea Estadounidense, la Farmacopea Europea, exigen que los bancos celulares y virales tengan certificado de libre de *Mycoplasma* y recomiendan para su detección un método microbiológico que si bien es muy sensible toma mucho tiempo su realización, y los resultados pueden ser subjetivos. Es por esto que se comenzaron a desarrollar métodos moleculares para la detección de este microorganismo.

Sumado a esta situación, su eliminación de cultivos celulares resulta compleja, por lo que en general se propone el descarte como primer método de eliminación frente a un cultivo contaminado. Esto genera el inconveniente de que si la cepa infectada es de gran importancia su descarte no es una medida posible. Existe una vasta bibliografía sobre la descontaminación de *Mycoplasma* en cultivos celulares, pero la literatura es muy acotada en cuanto a la descontaminación de cepas virales.

El desarrollo de esta Tesis se realizó en Virbac Uruguay S.A., una de las empresas líderes en el sector de salud animal. Durante la tesis se puso a punto un método de detección molecular para *Mycoplasma* y se comparó el mismo con el “*Gold Standard*”, método microbiológico, en forma cualitativa y estadística. Para ambos métodos, molecular y microbiológico, se escribió el correspondiente procedimiento operativo estándar (POE) de manera de dejar en la empresa, el conocimiento necesario para ejecutarlo en futuras ocasiones. Finalmente, se utilizó el método molecular como herramienta de detección de *Mycoplasma* en una cepa viral de interés para el laboratorio, lo que permitió desarrollar una estrategia para eliminarlo mediante el uso de filtros y antibióticos.

Estos tres puntos fueron desarrollados de manera exitosa resultando en un trabajo que por sobre todas las cosas, aporta valor a Virbac, ya que le permite contar con una técnica más eficiente de detección tanto desde el punto de vista de proceso como del punto de vista económico. Esto permite a la empresa, mantener su posición líder, y cerrar un círculo virtuoso de mejora continua. Por otro lado, disponer de un procedimiento de erradicación de *Mycoplasma* desde cepas virales permite a la empresa poder contar con cepas eventualmente contaminadas pero que podrían ser de interés para ser incluidas en nuevos productos o en productos comerciales ya existentes.

PALABRAS CLAVE

Mycoplasma, PCR, detección, eliminación, descontaminación, cepas virales, línea celular.

ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ARN: ácido ribonucleico
- CFR: *Code of Federal Regulations* (Código de Regulaciones Federales de Estados Unidos)
- DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
- DILAVE: División de Laboratorios Veterinarios
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato
- dpi: días post-infección
- DSMZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares).
- ECP: efecto citopático
- ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
- Ph. Eur.: *European Pharmacopeia* (Farmacopea europea)
- FDA: *Food and Drugs Administration* (Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos)
- GMP: *Good Manufacturing Practice* (Buenas Prácticas de Manufactura)
- IF: inmunofluorescencia
- IPMont: Instituto Pasteur de Montevideo
- LOD: *Limit of Detection* (límite de detección)
- MGAP: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
- MOI: *Multiplicity of Infection* (Multiplicidad de Infección)
- MVB: *Master Virus Bank* (banco maestro viral)
- NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (Centro nacional para la Información Biotecnológica – Estados Unidos)
- PCR: *Polimerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
- POE: Procedimiento Operativo Estándar
- PPLO: *Pleuropneumonia Like Organism* (Organismo similar a la pleuroneumonía)
- pADN: ácido desoxirribonucleico plasmídico
- rADN: ácido desoxirribonucleico ribosomal
- rARN: ácido ribonucleico ribosomal
- RODAC: *Replicate Organism Detection and Counting* (placas de conteo de microorganismos)
- RVB: Rotavirus Bovino
- SFB: Suero Fetal Bovino
- SPF: *Specific Pathogen Free* (libre de patógenos específicos)
- TAE: Tris-acetato-EDTA
- TCID₅₀: *Tissue Culture Infective Dose* (Dosis infectiva 50 en cultivos celular)
- ufc: unidades formadoras de colonias
- USP: *United States Pharmacopeia* (Farmacopea de los Estados Unidos)
- VBUY: Virbac Uruguay
- WVVB: *Working Virus Bank* (banco viral de trabajo)

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN.....	4
PALABRAS CLAVE.....	5
ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. <i>Mycoplasma</i> spp.....	8
1.2. Contaminación por <i>Mycoplasma</i>	9
1.3. Métodos de detección	13
1.4. Métodos de eliminación de la contaminación	18
1.5. Virbac Uruguay S.A.	21
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo general	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. METODOLOGÍA.....	24
3.1. Métodos de detección de micoplasma	24
3.2. Identificación de especies contaminantes de micoplasmas.....	28
3.3. Estudio de la contaminación por <i>Mycoplasma</i> de ratones de bioferio.....	29
3.4. Cultivo celular	29
3.5. Cultivo viral	30
3.6. Titulación de RVB mediante TCID ₅₀	32
3.7. Eliminación de la contaminación de micoplasma a partir de un cultivo de RVB infectado (RVB-1).....	32
3.8. Generación de un banco de desarrollo a partir de la cepa de RVB-2 descontaminada.	32
3.9. Evaluación de la contaminación ambiental por <i>Mycoplasma</i>	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. Puesta a punto de una PCR para la detección de <i>Mycoplasma</i> spp.....	33
4.2. Identificación de especies contaminantes de micoplasma	42
4.3. Descontaminación de micoplasma de sobrenadante viral.....	45
4.4. Estudio de contaminación en bioferio	46
4.5. Contaminación ambiental.....	48
5. ANÁLISIS ECONÓMICO.....	49
6. CONCLUSIONES.....	51
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Mycoplasma* spp.

1.1.1. Taxonomía

El género *Mycoplasma* refiere a un conjunto de bacterias que tiene como principal característica la falta de pared celular. Dentro del dominio bacteriano pertenecen al Filo *Tenericutes*, que son todas las bacterias que carecen de pared celular. Este Filo se compone solamente de una clase denominada Mollicutes. Como regla general se utiliza el nombre de *Mycoplasma* para referirse a cualquiera de los géneros dentro de la clase Mollicutes, aún cuando en esta clase existen otros ocho géneros como ser *Acholeplasma*, *Asteroleplasma* y *Spiroplasma*, (1, 2, 3). Dentro de la clase Mollicutes existen más de 100 especies (4). Por otra parte, análisis filogenéticos muestran que están estrechamente relacionados con las bacterias Gram positivas *Clostridia*, *Bacillus* y *Lactobacillus* (5).

1.1.2. Características

Mycoplasma es un nombre trivial utilizado para un grupo de procariotas con capacidad biosintética limitada que incluye a todo el género *Mycoplasma* y a algunas especies de los otros géneros dentro de la clase Mollicutes.

Sus principales características son:

1. Falta de pared celular

Debido a esto, los antibióticos utilizados de forma regular en la industria farmacéutica no los afectan (6, 7). Además, así como el resto de las bacterias, han logrado desarrollar resistencia a los antibióticos más comúnmente utilizados (4, 6, 8, 9). Por la falta de pared logran pasar por los sistemas de filtros utilizados en la industria para esterilizar diferentes medios de cultivos (4). A diferencia de otras membranas bacterianas, la membrana lipídica de micoplasma también contiene otros lípidos asociados, como el colesterol que agregan rigidez estructural a la membrana (10).

2. Metabolismo disminuido

Los micoplasmas necesitan tomar del ambiente dónde se encuentran aminoácidos, bases nucleotídicas y ácidos grasos. Debido a que no cuentan con una cadena respiratoria el ATP lo generan mediante una reacción simple de fermentación orgánica (10). A causa de que tienen muy pocos genes crecen lentamente por fisión binaria; *M. capricolum* tarda diez veces más en crecer que *Escherichia coli* (11). Requieren de esteroides para su crecimiento y síntesis de membrana los cuales toman del medio dónde se encuentran. Dependiendo de la especie pueden metabolizar glucosa (*M. pneumoniae*), arginina (*M. hominis*) o urea (*Ureaplasma* spp.). Son anaerobios facultativos y prefieren tensiones parciales de O₂ reducidas (13).

3. Forma pleiomórfica

Toman una gran variedad de formas que van desde esférica hasta filamentosa, con un diámetro de 0,2-0,8 µm, razón por la cual en un comienzo se denominaban PPLO (1, 9, 14).

4. Genoma pequeño

Contienen un genoma entre 580 kpb y 1380 kpb, el cual se encuentra completamente secuenciado para varias especies (10). *M. pneumoniae* contiene un solo cromosoma que codifica para 689 proteínas, mientras que *M. genitalium* contiene 470 genes (11). Si se lo compara con *E. coli*, que tiene un genoma de 4.640 kpb que codifica a 4.288 genes, es posible deducir desde el punto de vista genómico cómo los micoplasmas no podrían ser organismos de vida libre (15).

5. Varios hospederos

Los micoplasmas son conocidos patógenos de una gran variedad de especies, entre los que se encuentran los humanos, insectos, animales y plantas (3). Al menos tres cepas han demostrado ser patógenas para humanos: *M. pneumoniae* está asociado con neumonías en adultos y niños, mientras que *M. genitalium* y *M. hominis* son agentes reconocidos de las infecciones urinarias. Otras especies infectan animales y causan un amplio rango de enfermedades altamente contagiosas como agalaxia en cabras, pleuroneumonía en bovinos y enfermedades respiratorias en pollos (10).

6. Impacto en salud pública y laboratorios

Además de su impacto en la salud pública, los micoplasmas son un gran contaminante de laboratorios biotecnológicos, tanto a nivel industrial como de investigación. La contaminación por éstos puede ser difícil de controlar, ya que como se mencionó anteriormente son de pequeño tamaño, y a su vez pueden formar biofilms lo que los hace más resistentes al calor y a la desecación (10).

Tomando todas las consideraciones anteriores, se puede decir que los micoplasmas representan un riesgo de bioseguridad debido a la potencialidad de ocasionar infecciones en humanos y animales y problemas de contaminación en la producción biofarmacéutica y en laboratorios de investigación (10).

1.2. **Contaminación por *Mycoplasma***

1.2.1. Contaminación en cultivos celulares

El cultivo de líneas celulares eucariotas representa una herramienta muy importante en la investigación y manufactura de productos biológicos. El uso de estas células en diferentes laboratorios (investigación, medicina regenerativa, producción biotecnológica) está creciendo continuamente debido en parte, a las normativas cada vez más estrictas sobre el uso de animales de laboratorio (8, 16). Las células se utilizan con el fin de examinar funciones biológicas y producir sustancias bioactivas, y es por esto que deben existir controles rigurosos de las mismas para descartar cualquier contaminación (7).

Si bien el cultivo de células es una técnica muy difundida y cada vez más común de encontrar en laboratorios de investigación o a nivel industrial, requiere un manejo cuidadoso para evitar problemas. Dentro de los problemas asociados al cultivo celular existen dos tipos de contaminaciones que son las más comunes de observar: contaminación cruzada con otra línea celular, y contaminación con microorganismos, en particular micoplasmas (9, 17, 18, 19). La contaminación por micoplasmas representa un problema, ya que generalmente no es detectada en los controles de rutina utilizados en un laboratorio debido a que no producen turbidez en el medio de cultivo, no causan efecto citopático en las células, ni es observada bajo el microscopio debido a la falta de pared celular y a la capacidad de adherirse a la membrana de las células que poseen estos microorganismos (2, 8, 20, 21). Los micoplasmas pueden persistir sin ser detectados en cultivos celulares por largos periodos de tiempo sin afectar

visiblemente las células, llegando a un alto número de colonias en el cultivo (10^8 - 10^9 ufc/mL). Una vez contaminado, el cultivo llega a su concentración máxima en 3-5 días, y esto genera que haya una proporción de 100-1.000 micoplasmas por célula en un cultivo (6, 8, 9, 20, 22). Los cultivos celulares proveen un ambiente ideal para el crecimiento de estos organismos debido a las condiciones favorables de incubación, protección del estrés osmótico y a la presencia de todos los nutrientes esenciales necesarios para su desarrollo (6).

Las contaminaciones por micoplasmas en cultivos celulares pueden modificar casi todos los parámetros de las células, conllevando a resultados erróneos en ensayos donde se utilizaron células contaminadas o incluso a la pérdida de cultivos celulares únicos (Tabla 1) (8, 16, 23). Esta contaminación es capaz de generar alteraciones del metabolismo celular, como por ejemplo: inhibición de la proliferación, aumento de la muerte celular, inhibición de la fusión celular, aparición de características morfológicas de apoptosis, alteración de la morfología celular ya que los micoplasmas dependen del colesterol, esteroides y lípidos presentes en la membrana de las células. También son capaces de producir cambios en la genética de las células como ser aberraciones cromosómicas o fragmentación del ADN. Además, ocasionan interferencia en varios ensayos bioquímicos y biológicos y alteran la susceptibilidad de las células hacia los virus y la producción de virus (3, 7, 8, 14). Existen estudios que demuestran que estos microorganismos compiten por los nutrientes presentes en el medio, generando un agotamiento de los mismos, y los efectos *downstream* relacionados como la alteración de los niveles de proteínas, ADN y la síntesis de ARN (7). Incluso algunas de las especies de *Mycoplasma* hidrolizan arginina como fuente de energía, consumiendo rápidamente la arginina disponible en el medio lo que afecta el cultivo celular produciendo aberraciones cromosómicas (6). Ya que toman su energía de la fermentación de diversos nutrientes pueden causar un cambio en el pH en el medio y de esta forma producir metabolitos tóxicos para las células eucariotas (7). Por todos los efectos que presenta la contaminación por micoplasmas en cultivos celulares que se resumen en la Tabla 1, es que algunos autores sugieren hablar de infección y no contaminación, ya que así se describe de forma más adecuada el parasitismo que representan los micoplasmas para las células (22).

Tabla 1: Principales efectos de la infección por micoplasma en cultivos celulares. Adaptado de Drexler *et al.* (9)

• Niveles alterados de síntesis de proteínas, ARN y ADN
• Alteración del metabolismo celular
• Aberraciones cromosómicas (alteraciones numéricas y estructurales)
• Cambios en la composición de la membrana celular
• Alteración en la morfología celular
• Modificación de la activación linfocitaria
• Cambio en la expresión de citoquinas
• Variación de la propagación viral
• Interferencia con ensayos biológicos y bioquímicos
• Influencia en las señales de traducción
• Promoción de la transformación celular
• Alteraciones de las características de proliferación
• Degeneración y pérdida total del cultivo

Se estima que entre un 5 % a 30 % de los cultivos celulares eucariotas se encuentran contaminados por micoplasmas (2, 7, 8, 16, 17). Sin embargo, hay estudios que demuestran que la contaminación puede llegar hasta un 80 % en los laboratorios que no toman medidas de control de contaminación (8, 17). Existen cuatro fuentes principales de contaminación: las personas, el aire, los reactivos y las células en sí mismas (2, 4, 6, 8, 19, 22, 23) (Tabla 2).

Se ha observado que típicamente la contaminación dentro de un laboratorio suele darse por diseminación a partir de un único cultivo infectado no controlado y propagarse por el ambiente hacia los demás cultivos. Esto se ha confirmado a partir de la identificación de las cepas contaminantes dentro de un mismo laboratorio, donde generalmente suele ser la misma que está presente en todos los cultivos infectados (4, 6, 19-22). Es por esta razón es que es de suma importancia conocer el origen y la trazabilidad de las líneas que se utilizan (19). En caso de ingresar un nuevo cultivo celular de origen desconocido a un laboratorio éste debe entrar en una zona de cuarentena. Recién cuando se tiene un análisis negativo para la presencia de micoplasma este cultivo puede ingresar al laboratorio de células. Por estas razones es importante que se implementen ensayos de rutina dentro de los laboratorios de cultivo celular para controlar y así para evitar la contaminación por micoplasmas. Si se sospecha que un cultivo puede estar contaminado hay que evaluar dos situaciones dependiendo de la importancia de dicho cultivo: 1- descartarlo automáticamente sin realizarle controles o 2- pasarlo al área de cuarentena para su análisis, con el fin de evitar que la contaminación se propague por el laboratorio y trabajar en la recuperación del mismo (6).

El pequeño tamaño de los micoplasmas puede explicar la contaminación a partir de reactivos que fueron esterilizados mediante filtros como ser el suero o los medios de trabajo (10). Antiguamente los sueros se esterilizaban utilizando filtros de 0,2 μm , que permiten el pasaje de micoplasmas, por lo cual el suero era una de las principales fuentes de contaminación. Hoy en día los sueros vienen filtrados por filtros de 0,1 μm , incluso irradiados (radiación gamma), y a su vez, requieren de un certificado de ausencia de micoplasma (24). Estas modificaciones demuestran que la contaminación por micoplasmas fue y continúa siendo un problema real, que incluso desde los proveedores de materias primas se está buscando mitigar.

La alta concentración de micoplasmas en cultivos celulares explica en parte la facilidad con que se diseminan en un laboratorio. Cualquier manipulación de cultivos celulares contaminados genera gotas o aerosoles, las que sedimentan en segundos en el área de trabajo. Una gota puede llegar a tener 10^6 ufc de micoplasma, y estos son capaces de sobrevivir en superficies planas por días. Si no se desinfecta de forma adecuada, pueden infectar otro cultivo limpio cuando se manipula en la misma área de trabajo (10, 22).

Otra fuente importante de contaminación por micoplasma son los operadores. La ropa de trabajo contaminada o inadecuada es una fuente de contaminación, ya que varias especies de micoplasma son comensales en el cuerpo humano. Otra causa son las malas prácticas al momento de trabajar ya que las manos y la boca son los principales reservorios de micoplasma en el cuerpo, y si no se toman las precauciones necesarias pueden pasar a los cultivos. Hay que tener especial cuidado con la generación de aerosoles ya sea por estornudar o hablar frente a la cámara de flujo laminar, por lo que es de suma importancia el uso de tapaboca y guantes estériles (8).

Existen sólo algunos géneros de Mollicutes que aparecen normalmente como contaminantes de cultivos celulares: *Mycoplasma* y *Acheoplasma* (6, 20). Dentro de estos géneros existen al menos veinte especies que contaminan los cultivos celulares (23). De estas veinte especies, solo seis son las causantes del 95 % de las contaminaciones (Tabla 2) (2, 16, 23).

Tabla 2: Especies comúnmente encontradas como contaminantes de cultivos celulares Adaptado de Drexler *et al.* (9)

Especies	Frecuencia	Origen	Fuente de contaminación para células	Observaciones
<i>M. orale</i>	20-40 %	Humano	- Contaminación por operador	- Crecimiento lento en agar
<i>M. hyorhinis</i>	10-40 %	Porcino	- Tripsina - Cruce de cepas en matadero	- No puede ser cultivado en agar - Puede invadir células
<i>M. arginini</i>	20-30 %	Bovino	- Suero	- Fácil de cultivar en agar
<i>M. fermentans</i>	10-20 %	Humano	- Contaminación por operador	- Difícil cultivo en agar - Puede invadir células
<i>M. hominis</i>	10-20 %	Humano	- Contaminación por operador	
<i>M. laidlawii</i>	5-20 %	Bovino	- Suero	- Crece fácilmente en agar, en un amplio rango de temperaturas

Las especies más frecuentemente aisladas desde cultivos celulares provienen de la flora humana o bovina lo que refleja la importancia como fuente de contaminación el suero, el origen celular y los operarios (6, 8) (Tabla 2).

A nivel de laboratorio de investigación, los micoplasmas pueden alterar una gran variedad de parámetros celulares como ya se detalló en la Tabla 1. Estos cambios en las células llevan en gran parte a tener problemas durante la investigación y resultados cuestionables (16). El uso de líneas celulares para la investigación de funciones biológicas y la producción de sustancias bioactivas necesita un riguroso control de calidad para asegurar que no existe ninguna contaminación que esté afectando dichos resultados. Algunas revistas científicas piden, para investigaciones que requieren del uso de líneas celulares o cepas virales, un certificado de libre de micoplasma de las mismas (24).

A nivel de la industria biofarmacéutica, se ha demostrado que la contaminación por micoplasma puede causar problemas en la manufactura de productos biológicos, que pueden afectar la calidad de estos (7, 10, 14). Los cultivos de células eucariotas utilizados en producción para el desarrollo de productos biológicos deben ser testeado para verificar la ausencia de micoplasma como parte de la certificación de seguridad y pureza, ya que la contaminación puede generar consecuencias económicas de gran porte, como ser el descarte de lotes enteros de producción (2, 8, 14, 20, 23, 25).

1.2.2. Contaminación en cultivos virales

Como se mencionó anteriormente, dado que la contaminación por micoplasma es muy frecuente en cultivos celulares, también lo es en cultivos virales, representando un problema frecuente y serio en los laboratorios de virología. La contaminación con micoplasmas tiene consecuencias en las cepas virales, las cuales están estrechamente relacionadas con el estado de las células. Debido a su efecto en las células, los micoplasmas generan que las cepas virales se degraden o reduzcan su replicación. Utilizar células infectadas puede arrojar resultados falsos, como títulos virales más bajo en los controles de calidad; además si son utilizadas a nivel industrial en preparaciones biológicas virales, el problema se asocia directamente con una pérdida económica (23, 26).

El mayor reto que presentan estas contaminaciones es lograr eliminarlas sin perder el título viral utilizando un método económico y versátil para todas las cepas virales (23). Mientras que

las células contaminadas se pueden descartar sin presentar un gran problema, las cepas virales suelen ser en mayor proporción irremplazables, lo que obliga a aplicar métodos de descontaminación en las mismas (26).

1.2.3. Contaminación en bioterios

Numerosas especies de *Mycoplasma* forman parte de la flora comensal de los animales roedores, dentro de los que se encuentran los roedores de experimentación.

M. pulmonis, *M. arthritidis*, *M. neurolyticum*, *M. muris* y *M. collis* son especies comúnmente asociadas a roedores que pueden estar vinculadas con varias enfermedades. La micoplasmosis respiratoria es una enfermedad de ratones y ratas causada por *M. pulmonis*. Si bien *M. pulmonis* puede causar alta morbilidad, las infecciones suelen permanecer imperceptibles. Además de las complicaciones asociadas a la enfermedad respiratoria, la infección por *Mycoplasma* puede mediar la respuesta inmune, generando severos problemas en las colonias de roedores de laboratorio. Por este motivo, hay que tener mucha precaución ya que se puede ver comprometida la validez científica de los experimentos realizados con animales infectados (27, 28).

Los animales SPF llevan un plan de monitoreo periódico de presencia de *Mycoplasma*, lo que demuestra, una vez más, la importancia de esta contaminación y la gestión general que se está haciendo a nivel de laboratorios para tenerla controlada.

1.3. Métodos de detección

Existen varias técnicas de detección de micoplasma (Tabla 3), que en su mayoría son complejas, de interpretación subjetiva, largas o costosas (9, 18).

Tabla 3: Técnicas de detección para micoplasmas.

Adaptado de Drexler *et al.* (9)

Tinción histológica

- Tinciones histoquímicas y microscopía de luz

Microscopía electrónica

- De transmisión
- De barrido

Métodos bioquímicos

- Ensayos enzimáticos
- Separación por gradiente/electroforesis de ARN marcado
- Análisis proteico

Métodos inmunológicos

- Tinción con anticuerpos fluorescentes
- ELISA
- Autorradiografía

Tinción del ADN por fluorocromos

- Tinción con DAPI
- Tinción con Hoechst 33258

Cultivo microbiológico

- Formación de colonias en agar

Hibridación de ARN

- De filtro
- Líquida

PCR

- Específica para género/especie
- Universal
- En tiempo real

El método de detección ideal debería ser específico y sensible, y a la vez rápido, eficiente y barato (17).

1.3.1. Cultivo microbiológico

El cultivo microbiológico para la detección de micoplasma es el método de referencia de los protocolos de GMP, lo que lo hace el “*Gold Standard*” (4, 18). Las guías de productos biológicos veterinarios de Estados Unidos requieren que todos los productos y sustratos obtenidos a partir de células eucariotas tengan controles para la contaminación por micoplasma utilizando el método caldo/agar descrito en el 9 CFR §113.28 (6, 8, 14, 25, 29, 30). Se propone también en las guías de la FDA que para las especies no cultivables la muestra debe ser sometida a una tinción de ADN (4, 25). Se considera que estos dos métodos combinados presentan una muy buena sensibilidad y especificidad, y es por esto que se utilizan como metodología de referencia (8, 16). A su vez, el método microbiológico presenta como ventajas que no deberían existir falsos positivos, y permite evaluar reactivos como medios y sueros además de cultivos celulares (6).

Sin embargo estos ensayos presentan varios inconvenientes. Si bien el método microbiológico es muy sensible, lleva mucho tiempo y la lectura de las placas es muy laboriosa (21). Debido al lento crecimiento de algunas especies, se debe esperar al menos 28 días para obtener el resultado del ensayo (6, 14, 29). Además puede presentar falsos negativos ya que existen especies de *Mycoplasma*, como *M. hyorhinis*, que no son cultivables (6, 8, 9, 18, 21).

En este método, se deben inocular placas de agar y caldo de enriquecimiento con la muestra problema y los controles adecuados (positivo y negativo) e incubar las placas durante 28 días en anaerobiosis (8, 9, 29, 30) (Figura 1). A causa del pequeño tamaño de los micoplasmas, sus colonias son microscópicas (diámetro 100-400 μm) con forma característica de huevo frito que crecen bajo la superficie del agar (Figura 2). La inspección de las placas de cultivo debe hacerse bajo observación microscópica, lo que genera una tarea tediosa y subjetiva ya que la morfología y tamaño de las colonias puede variar mucho según la especie, el medio de cultivo y la etapa de crecimiento (8, 9, 14, 29). Es por esto que se necesita un operador entrenado para leer los resultados de las placas de agar (18, 29). También presenta como desventaja la necesidad de controles positivos, los cuales pueden generar contaminaciones dentro del laboratorio (4, 9).

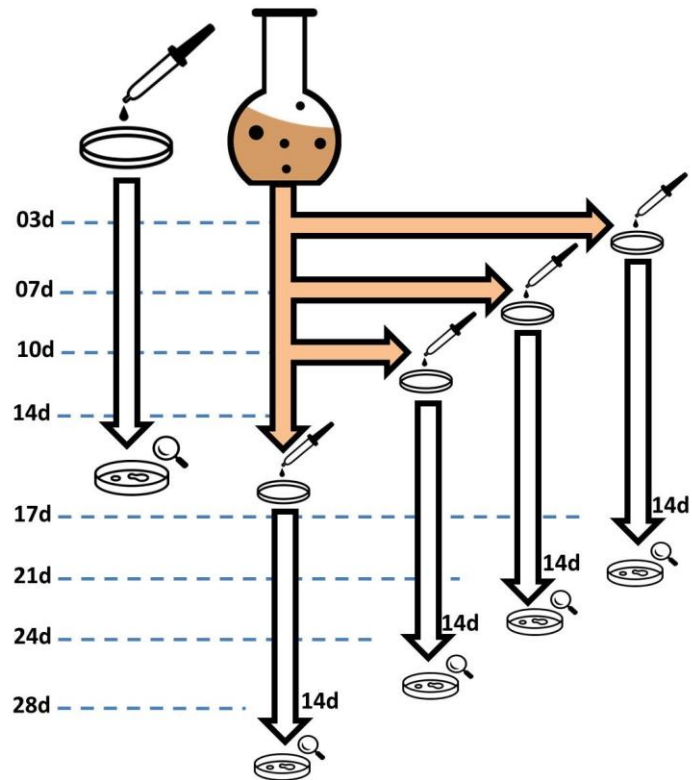


Figura 1: Esquema de tratamiento de muestras para la detección de micoplasma según CFR. Cada muestra debe ser sembrada directamente en placa de agar con medio específico y en caldo de enriquecimiento (100 mL, dilución 1/X). Se deben tomar 4 muestras de dicho caldo a los 3, 7, 10 y 14 días post-inoculación y sembrarlas en placas de agar, incubando las placas durante un período mínimo de 14 días adicionales. Cada placa de agar se debe dejar incubando un mínimo de 14 días y un máximo de 28 días. Este procesamiento debe realizarse a la muestra a analizar así como a un control positivo y un control negativo.

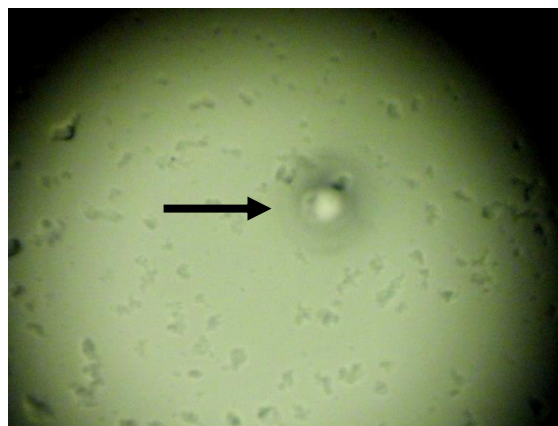


Figura 2: Microscopía óptica de una colonia de *Mycoplasma* que presenta la típica forma de "huevo frito" (40X) (realizada en el transcurso de la tesis).

Desde el 2007, la Ph. Eur., así como la USP, permiten reemplazar el método clásico de detección de micoplasma por un ensayo molecular siempre y cuando éste haya sido correctamente validado (6, 31, 32).

1.3.2. PCR

La necesidad de contar con un método más rápido, sensible y específico, llevó al desarrollo de nuevas tecnologías principalmente las moleculares (2, 16, 21, 29). Las técnicas moleculares se implementaron a partir de la década del 80 con el uso de sondas de ADN o genómicas (17). El primer reporte que muestra la utilización de la PCR como método de diagnóstico para micoplasma fue en 1989 (9).

Existen tres tipos de PCR para micoplasma, donde su uso depende de la aplicación que se esté buscando (18):

- Género específica: para detectar la presencia de micoplasma en una muestra problema (*Mycoplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma*)
- Identificatoria: para la identificación de la especie de micoplasma presente en una muestra problema. Consiste de una reacción de PCR seguida de la secuenciación o ensayo de restricción sobre el producto de PCR obtenido (*M. fermentans*, *M. arginini*, *M. bovis*)
- Especie específica: para la detección de una especie de micoplasma en particular en una muestra problema. Es generalmente utilizada en el diagnóstico médico y no en ensayos de rutina de laboratorio.

Existe una variedad de conjuntos de *primers* disponibles (simples, multiplex, nested), y el diseño de los mismos dependerá de la aplicación de la PCR. Para las PCR género específicas o identificatorias, la mayoría de los *primers* utilizan regiones conservadas del rARN 16S para intentar detectar un gran número de especies diferentes de micoplasma en una única reacción (4). Debido a que el rARN es esencial en la maquinaria de traducción, su gen se ha mantenido conservado durante la evolución lo que lo vuelve una buena herramienta filogenética. Este gen tiene un tamaño de 1500 pb, y contiene regiones conservadas que permiten su uso para identificación de géneros o especies, y a su vez contiene regiones internas que son hipervariables entre especies, lo que permite en muchos casos identificar diferentes especies, (12).

En la literatura se encuentran reportados por diversos autores (Wirth, Wong-Lee y Lovet, Uphoff) diferentes pares o juegos de *primers* para la detección de micoplasma. Cada uno de ellos presenta sus ventajas y desventajas, que se mencionan en la Tabla 4.

Tabla 4: Ventajas y desventajas de los sets de *primers* descritos en literatura para la detección de micoplasma.

Grupo de trabajo	Tipo de PCR	Ventajas	Desventajas
Wirth et al.	Nested PCR	-Alta especificidad -No presenta reacciones cruzadas con otras especies	-Conlleva el doble de tiempo que la Multiplex PCR
Wong-Lee y Lovet	PCR	-PCR universal para Mollicutes	-Especificidad media -Presenta reacciones cruzadas con otras especies
Uphoff et al.	Multiplex PCR	-Alta especificidad -PCR simple (corta) -No presenta reacciones cruzadas con otras especies	-Varios <i>primers</i> puede complejizar la PCR

La técnica de PCR presenta la gran ventaja de poder trabajar con muestras de orígenes diversos (materias primas, sueros, medios cultivo, cultivos celulares y virales, etc); además de poder analizar material congelado o liofilizado, lo que le da una gran versatilidad (2, 6, 9, 16).

Por todo lo señalado anteriormente, el método de PCR presenta varias ventajas respecto a otros métodos de detección de micoplasma, ya que combina simpleza y rapidez con alta especificidad y sensibilidad sumando objetividad, exactitud y reproducibilidad en los resultados (8, 17, 18, 20, 25). Por las ventajas que presenta este ensayo, tiene el potencial para reemplazar la técnica microbiológica actual del CFR o en su defecto ser una técnica complementaria con el fin de disminuir los tiempos de prueba (20, 29).

En el trabajo descrito a continuación se buscó poner a punto una PCR como método de detección de micoplasma. Se eligieron los primers de Uphoff *et al.* para esta puesta a punto ya que esta PCR resulta más sencilla que la desarrollada por Wirth *et al.* porque solo requiere de una reacción de PCR al contrario de la Wirth. Además esta PCR está ampliamente estudiada por diferentes grupos de trabajo, en los cuales se ha demostrado su gran sensibilidad, especificidad y la no reactividad con ADN proveniente de especies estrechamente emparentadas a los micoplasma.

1.3.3. Otros métodos de detección

En el método de tinción se fijan las células y se las tiñe con un compuesto fluorescente de unión al ADN, para luego ser analizadas bajo un microscopio fluorescente (Figura 3) (14). Si se observa contaminación se ve un puntillado en el citoplasma de las células o en el exterior de las mismas. Si bien es una técnica rápida y sencilla que permite la identificación de contaminación por micoplasma en cultivos celulares, la tinción de ADN no es específica por lo que se puede estar detectando otro microorganismo, haciendo que los resultados puedan ser de difícil interpretación. Se aplica generalmente debido a que *M. hyorhinis* no es cultivable, por lo que no puede detectarse mediante la técnica de cultivo de referencia. Asimismo si las condiciones del cultivo no son óptimas, se puede malinterpretar los resultados ya que se puede detectar ADN proveniente de las células lisadas (4, 6, 8). Hay que tener en cuenta que *M. orale* y *M. arginini* solo se adhieren débilmente a la superficie celular, lo que puede generar un falso negativo (3).

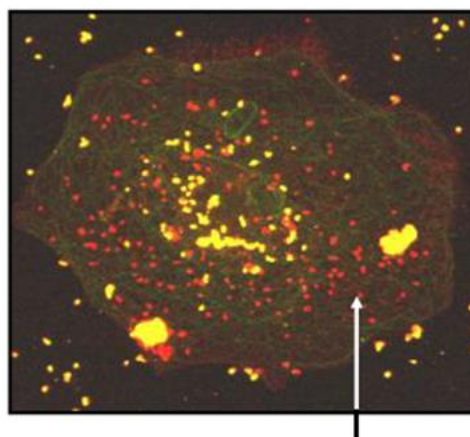


Figura 3: Se observa *M. gallisepticum* intracelular teñido con sonda fluorescente FIT-C de unión al ADN (puntos amarillos *Mycoplasma* extracelular puntos rojos señalados con flecha: *Mycoplasma* intracelular) (6).

Por otro lado, se encuentran disponibles diferentes kits comerciales capaces de detectar el ATP producido por los micoplasmas por la enzima acetato kinasa o la cabamato kinasa mediante una reacción con luciferina/luciferasa. Es una técnica sencilla y rápida, donde primero es necesario extraer las células del medio para no obtener falsos positivos. Es un ensayo que presenta una sensibilidad de 10^5 ufc/mL y se puede utilizar como ensayo de rutina; aunque sus costos son elevados comparados con otros ensayos (6).

Finalmente, existen desarrolladas técnicas de inmunodetección con anticuerpos monoclonales específicos (ej. ELISA) que permiten detectar 4 de las 6 especies más comunes en cultivos celulares (6). Sin embargo, los kits comerciales disponibles hasta el momento no permiten detectar *M. fermentans*, el cual es un contaminante que está aumentando año a año en los laboratorios (3).

1.4. Métodos de eliminación de la contaminación

Idealmente un método de eliminación debe ser simple, rápido y efectivo (26). Varios métodos fueron descritos para la erradicación de micoplasma (Tabla 5). Algunos de estos están restringidos a superficies, como el uso de detergentes, otros a soluciones libres de células como la filtración por microfiltros o el tratamiento con rayos gamma. Algunos de estos métodos de eliminación aplican para algunas especies en particular como el tratamiento de células con un suero anti-mycoplasma (7).

Tabla 5: Métodos de eliminación de micoplasma
Adaptado de Drexler *et al.* (9)

<p>Método físico</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento con calor • Filtración por microfiltros • Inducción de daño cromosómico o de la membrana celular por fotosensibilización
<p>Métodos químicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detergentes • Limpieza con cloroformo-éter • Tratamiento con metilglicina • Incubación con polianetolsulfonato de sodio • Cultivo con 6-methylpurina desoxirribosa
<p>Procedimientos inmunológicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Co-cultivo con macrófagos • Pasajes <i>in vivo</i> en ratones • Cultivo con suero específico anti-mycoplasma • Exposición al sistema complemento • Clonación celular
<p>Métodos quimioterapéuticos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tratamiento con antibióticos en cultivo • Tratamiento con antibióticos + suero hiperimmune o cultivo con macrófagos • Cultivo en medio semi-sólido con antibióticos

1.4.1. Desinfección de superficies

Los micoplasma son generalmente considerados más sensibles a la desinfección que otras bacterias debido a su falta de pared celular, ya que ésta es considerada como un mecanismo intrínseco de resistencia a biocidas (10). Pero los estudios presentes en la bibliografía han demostrado que, al contrario de lo que se piensa, los micoplasmas presentan una gran resistencia a muchos de los agentes comúnmente utilizados para la desinfección de superficies.

Estudios han demostrado que los compuestos de amonio cuaternario (QAC) presentan baja eficacia sobre los micoplasmas debido a la presencia de una estructura de membrana celular única. Los QAC son moléculas cargadas positivamente que se unen fuertemente a las paredes celulares cargadas negativamente y particularmente a las membranas celulares, dando como resultado la disrupción de la célula. Sin embargo, el amonio cuaternario no suele ser efectivo debido a que la membrana de micoplasma contiene colesterol lo que puede retardar la integración del QAC en la estructura de la misma (10).

Por otro lado, los alcoholes actúan principalmente formando enlaces de hidrógeno con proteínas, lo que lleva a la pérdida de estructura y función y a la coagulación de moléculas. Varios estudios demuestran que los alcoholes inhiben el crecimiento y desencadenan la lisis rápida de micoplasmas (9, 10).

La desinfección de superficies con vapor de peróxido de hidrógeno (VPH) muestra ser un muy buen método. Como se mencionó anteriormente, dado que los micoplasmas no poseen pared celular, el VHP no causa el mismo efecto a nivel celular en éstos como en el resto de las bacterias (33). Pero este no es el único mecanismo conocido del VPH, sino que también tiene efecto directo sobre las proteínas y el ADN desnaturalizándolos (33, 34). Por esto la fumigación con VHP puede ser de uso práctico en áreas o materiales con alto riesgo de contaminación, por ejemplo en laboratorios/áreas en donde se trabaja con bancos de células madre, producción de vacunas, investigación con animales, productos lácteos, y otros (10, 35).

Existen varios compuestos comerciales que utilizan estos agentes químicos o combinaciones de ellos para usarlos rutinariamente como método de desinfección de áreas y superficies. Esto muestra, nuevamente, la gran importancia que tiene la contaminación por micoplasma para los laboratorios, y cómo se está intentando combatir desde todos los ángulos posibles.

1.4.2. Desinfección de cultivos celulares

Si bien lo recomendable para hacer frente a una contaminación por micoplasma en cultivos celulares es el descarte del cultivo, en muchas situaciones esto no puede realizarse (ej. material irremplazable). En estos casos, se debe recurrir a diferentes estrategias para la eliminación de la contaminación del propio cultivo. Las diferentes técnicas reportadas en la literatura hacen uso de antibióticos. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los tratamientos anti-micoplasma suelen presentar diferentes grados de toxicidad para las células y que el proceso de eliminación de la contaminación puede ser largo (hasta dos meses) (4, 8, 16).

Existen tres tipos de antibióticos que presentan una actividad alta frente a micoplasma: tetraciclinas, macrólidos y quinolonas (7, 8, 9, 23) (Tabla 6). Los macrólidos y tetraciclinas actúan inhibiendo la síntesis de proteínas uniéndose a distintas subunidades de los ribosomas. Las quinolonas, por su parte, inhiben la replicación del ADN obstruyendo la girasa bacteriana (8, 23). Sin embargo, dado que los micoplasmas carecen de pared celular todos los antibióticos beta-lactámicos no pueden ser empleados. Asimismo, existen reportes en la literatura de la generación de resistencia a los antibióticos más comúnmente utilizados en los laboratorios (Figura 4).

Antibiótico	Tipo de antibiótico	Resistencia
Cloranfenicol	Tetraciclina	30 %
Clortetraciclina	Tetraciclina	11 %
Ciprofloxacina	<u>Quinolona</u>	15 %
Eritromicina	Macrólido	98 %
Espectinomicina	Macrólido	14 %
Estreptomina	Aminoglucósido	88 %
Gentamicina	Aminoglucósido	80 %
Kanamicina	Aminoglucósido	73 %
Lincomicina	Lincosamida	28 %
Neomicina	Aminoglucósido	86 %
Tetraciclina	Tetraciclina	14 %
Tilosina	Macrólido	21 %

Figura 4: Resistencia de micoplasma a diferentes antibióticos.
Adaptada de Nikfarjam *et al.* (8)

La bibliografía propone tres formas de tratar las células contaminadas: utilizando un único tipo de antibiótico, utilizando dos antibióticos diferentes a la vez (ej. Plasmocin), o alternando el uso de dos antibióticos diferentes (ej. BM-Cyclin). Los mejores resultados se han obtenido con el uso de varios antibióticos de manera de evitar la generación de resistencia. Varios estudios han probado la eficacia de ciertos antibióticos anti-micoplasma en cultivos celulares, por ejemplo Uphoff (16) mostró que el BM-Cyclin tenía una eficacia de 86 %, mientras que el Plasmocin de 85 % y el Baytril de 76 %.

Tabla 6: Antibióticos contra micoplasma (NE: no se especifica)
Adaptado de Nikfarjam *et al.* (8)

Nombre comercial	Nombre genérico	Categoría del antibiótico	Eficacia (16)
BM-Cyclin	Tiamulina (BM-Cyclin 1)	Macrólido	86 %
	Minociclina (BM-Cyclin 2)	Tratraciclina	
Ciprobay	Ciprofloxacina	Quinolona	--
Baytril	Enrofloxacin	Quinolona	76 %
Zagam	Sparfloxacina	Quinolona	--
MRA	NE	Quinolona	--
Plasmocin	NE	Macrólido	84 %
	NE	Quinolona	

El Plasmocin (InvivoGen) es un antibiótico comercial de bajo costo (menos de U\$S 1 por reacción) que contiene una mezcla de una quinolona y un macrólido, por lo que logra actuar sobre los micoplasmas libres en el sobrenadante y sobre los que son internalizados por las células (23). En ensayos previos, se ha reportado que con el uso de Plasmocin fue posible descontaminar correctamente un 84% de los cultivos celulares ensayados, mientras que el otro 16% no se pudo descontaminar o bien porque las cepas contaminantes eran resistentes al Plasmocin o bien porque éste era tóxico para la línea celular en cuestión (16).

1.4.3. Cultivos virales

Al igual que las recomendaciones existentes para los cultivos celulares, frente a una contaminación por micoplasma en cultivos virales se sugiere la eliminación del cultivo. Sin embargo, no siempre se pueden reemplazar los cultivos contaminados (aislamientos únicos) o incluso muchas veces las cepas vienen contaminadas desde el origen.

Varias técnicas son descritas en la bibliografía sobre la eliminación de la contaminación por micoplasma en cultivos virales, siendo la mayoría imprácticas y difíciles de desarrollar (extracción por solventes, ultracentrifugación, entre otras). Para el caso de cultivos virales, el método de eliminación no sólo no debe afectar la carga viral (disminución del título viral), sino que tampoco puede afectar las células donde este virus se propaga. Por un lado se encuentran los métodos de filtración, donde se utilizan membranas con un poro que en teoría permite el pasaje del virus en cuestión pero retiene a los micoplasma contaminantes (0,1 µm). Sin embargo estos métodos no son 100% eficientes, ya que parte del virus queda finalmente retenido en la membrana del filtro (26).

Por otro lado, existen diferentes trabajos donde se reporta el uso de los mismos antibióticos descritos para la descontaminación de líneas celulares pero aplicado a la descontaminación de líneas virales (23, 26). El uso de antibióticos comerciales como Mycokil AB (GE) o Plasmocin fue exitoso para la eliminación de la contaminación por micoplasma en cepas virales sin afectar el título viral final.

1.5. **Virbac Uruguay S.A.**

El Grupo Virbac es una de las empresas líderes a nivel mundial en salud y cuidado animal. Fundada en 1968 Virbac ha crecido hasta convertirse en una de las empresas más reconocidas a nivel mundial en la salud animal.

Desde su fundación, Virbac ha dedicado gran parte de sus recursos en investigación y desarrollo enfocándose al tratamiento de enfermedades de animales de compañía y ganado. Se trata de una empresa que innova y se mantiene relevante gracias a dicho proceso. Dentro de sus ramas de investigación, de las cuales varias son de carácter biotecnológico, se encuentran el desarrollo de vacunas, el cuidado de animales domésticos, productos para las agroindustrias entre otros.

Los productos de Virbac son reconocidos y comercializados en más de 100 países. Como parte de su estrategia de globalización Virbac se ha establecido directamente en varios países creando filiales a partir de la compra de empresas del ramo ya establecidas. En Uruguay, Virbac adquirió en el 2013 al reconocido Laboratorio Santa Elena S.A. y sus instalaciones, fundados en Uruguay en 1957, convirtiéndose en Virbac Uruguay S.A. (VBUY). Esto le permitió al Grupo tener una base en la región con experiencia en el desarrollo y elaboración de productos para animales de producción y así ampliar su portafolio de productos, además de contar con un nuevo centro de investigación y desarrollo.

Mediante la gestión de la empresa francesa, se espera que los productos manufacturados en VBUY, que hoy por hoy se encuentran limitados a los mercados locales y regionales (Brasil, Argentina, Colombia, Bolivia, Paraguay, Cuba, Costa Rica y México), se puedan exportar a otros mercados más exigentes, requiriendo para esto cumplir con las más altas normas internacionales.

Los productos comercializados en la actualidad por la filial son de origen tanto biológico como farmacológicos. El primer grupo corresponde a las vacunas para utilización en ganado y animales domésticos. Dichas vacunas son el principal producto de venta local y regional.

En el proceso de producción de vacunas, y acorde a lo pautado por las normativas internacionales, Virbac toma especial cuidado en controlar posibles contaminantes que pueden provenir de las materias primas o ser introducidos en los procesos de manufactura. Es por esto que es de suma importancia el estudio y control de los posibles contaminantes que pueden aparecer en los procesos de manufactura, y estos controles deben ser eficientes y económicamente rentables. En particular, uno de los posibles contaminantes relevados por la literatura, tanto en el producto final como en las materias primas requeridas para su elaboración, son los micoplasmas.

1.5.1. Propuesta de valor

Por lo mencionado anteriormente es de especial interés para las empresas del ramo de salud animal, tener desarrollado un método validado para la detección de micoplasma y contar con un método de eliminación de una posible contaminación de líneas celulares o cepas virales.

Contar con dichos procedimientos es una ventaja a nivel competitivo en el rubro, que permite optimizar costos, y posicionar a Virbac en forma ventajosa frente a la competencia, incluso generando una relativa independencia de servicios externos que realizan dichos estudios.

Desde el punto de vista económico, el impacto de estos procedimientos es tanto directo, en cuanto al menor gasto en servicios de terceros, como indirecto, asociado al valor agregado que le otorga al producto final. Por otro lado, las herramientas de control y descontaminación de micoplasma permiten la implementación de medidas preventivas o correctivas, respectivamente.

Consideramos sumamente importante que una empresa líder del mercado, como es Virbac, cuente con las herramientas descritas en este trabajo ya que le permitirán a futuro, garantizar la sustentabilidad de los procesos de control y descontaminación de micoplasma.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Puesta a punto y validación de un ensayo de PCR para detección, cuantificación y tipificación de *Mycoplasma* spp.

2.2. Objetivos específicos

- Poner a punto un protocolo de PCR para la detección de *Mycoplasma* spp. en muestras de cultivos celulares y sobrenadantes virales.
- Determinar algunos parámetros para la validación del ensayo de PCR para la detección de *Mycoplasma* spp.
- Poner a punto un protocolo de eliminación de la contaminación por *Mycoplasma* spp. en cepas virales.
- Generar un banco viral libre de *Mycoplasma* spp.

3. METODOLOGÍA

Todos los reactivos químicos utilizados fueron de la más alta pureza de Sigma-Aldrich o Difco. Los reactivos para la PCR fueron adquiridos en Invitrogen y Bioron. Los *primers* fueron sintetizados por MacroGen Inc.

3.1. Métodos de detección de micoplasma

3.1.1. Microbiológico

3.1.1.1. Manipulación en condiciones de esterilidad

Se trabajó en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar Clase II tipo A2 (Trox FLV 432). Se utilizó ropa, guantes y tapa boca estériles.

3.1.1.2. Preparación de medio selectivo para micoplasma

Se procedió a la detección de micoplasma mediante el método “*Gold Standard*” descrito en el capítulo 9 CFR § 113.28 (30).

Se preparó 1 L de medio de cultivo según la siguiente receta: 6 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 5 g de cloruro de sodio, 0,9 g de extracto de levadura, 14 g de agar-agar, 700 mL de agua. Se esterilizó por calor durante 20 minutos a 121°C. Se dejó enfriar el medio (con cuidado de evitar la solidificación del agar) y se agregaron 300 mL de suero equino o bovino.

Las placas se prepararon agregando entre 20 mL y 25 mL por placa del medio anterior tibio. Se almacenaron a 4°C por un máximo de tres meses. Cada lote de placas preparadas se validó para su uso mediante la incorporación de un control positivo (sembrado de una muestra positiva para micoplasma) y negativo (agua).

3.1.1.3. Preparación, incubación y lectura de las placas

Por cada placa, se sembraron 200 µL de muestra por rastrillaje y se incubaron en cámara de anaerobiosis generada mediante sobres de Anaerogen (Oxoid). Las placa se incubaron durante tres semanas y el Anaerogen se cambió una vez por semana. Transcurridas las tres semanas de incubación, se procedió a la lectura de las placas mediante observación bajo microscopio con un aumento de 40 X (objetivo 4 X y ocular 10 X).

La presencia de una sola colonia, con la forma característica de micoplasma (Figura 2), luego de la incubación, fue suficiente para considerar una muestra positiva.

3.1.2. Molecular: PCR

Para el protocolo de detección de micoplasmas mediante PCR se utilizó el descrito en el trabajo de Uphoff *et al.* (2002). En esta PCR se utiliza un juego de *primers* que incluyen siete *primers Forward* y tres *primers Reverse*, descritos inicialmente en el trabajo realizado por Wirth, M. *et al.* (1994) (3) (Tabla 7). Los *primers* elegidos amplifican una región del gen del rARN 16S. Se ha descrito en diferentes trabajos, que permiten amplificar regiones de las seis especies de micoplasma más comúnmente encontradas como contaminantes de cultivos y unas 20 especies más de esta familia, pero no amplifican otros contaminantes comunes de cultivos celulares (36).

Tabla 7: *Primers* utilizados para la amplificación de una región 3' del rADN de 16S para diferentes especies de micoplasma. Los *primers Forward* y *Reverse X.1* y *X.2* se diferencian únicamente en la degeneración de una base, la cual se destaca en mayúscula y negrita. Adaptado Uphoff *et al.* (16)

Primer Forward	Secuencia	Especie de micoplasma que reconoce	Longitud del amplicón (pb)
Forward 11	cgc ctgagt agt acg tCc gc	<i>M. fermentans</i> , <i>M. bovis</i>	518
Forward 12	cgc ctg agt agt acg tAc gc	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	525
Forward 21	tgc ctg Ggt agt aca ttc gc	<i>Ureaplasma</i> spp.	504
Forward 22	tgc ctg Agt agt aca ttc gc	<i>M. gallisepticum</i>	504
Forward 31	c Gc ctg agt agt atg ctc gc	<i>M. arginini</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. hyorhinis</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. pneumoniae</i>	520, 522, 518, 520, 517
Forward 32	c Ac ctg agt agt atg ctc gc	<i>M. pulmonis</i>	518
Forward 4	cgc ctg ggt agt aca ttc gc	<i>M. pirium</i>	504
Primer Reverse			
Reverse 11	gcg gtg tgt aca a Ga ccc ga	<i>M. arginini</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. fermentans</i> , <i>M. gallisepticum</i> , <i>M. hominis</i> , <i>M. orale</i> , <i>M. pirium</i> , <i>Ureaplasma</i> spp.	
Reverse 12	gcg gtg tgt aca a Aa ccc ga	<i>M. hyorhinis</i> , <i>M. pneumoniae</i>	
Reverse 2	gcg gtg tgt aca aac ccc ga	<i>A. laidlawii</i>	

3.1.2.1. Controles de la PCR

Para cada ensayo de PCR se utilizaron tres controles:

- Control Negativo: se agregó el volumen en agua correspondiente al ADN molde.
- Control Positivo: preparación obtenida a partir de un sobrenadante viral infectado con *Mycoplasma* spp. El tamaño esperado del amplicón es de aproximadamente 500 pb.
- Control Interno: plásmido con una secuencia inserta trunca del rARN 16S de *M. arginini*. El tamaño esperado del amplicón es de 1000 pb, lo que permite diferenciarlo del amplicón obtenido en los casos de muestras positivas para micoplasma. La incorporación del control interno a las corridas es de vital importancia, ya que permite descartar falsos negativos dados por inhibición de la enzima u otros errores técnicos (ver Figura 5). La construcción plasmídica fue cedida amablemente por el Dr. Uphoff, científico perteneciente del Departamento de líneas celulares humanas y animales del Instituto Leibniz-DSMZ (Alemania). Este instituto es de referencia en cuanto al desarrollo de técnicas para la detección de micoplasma. Por cada reacción se agregan entre 0,5 y 1 ng de control interno.

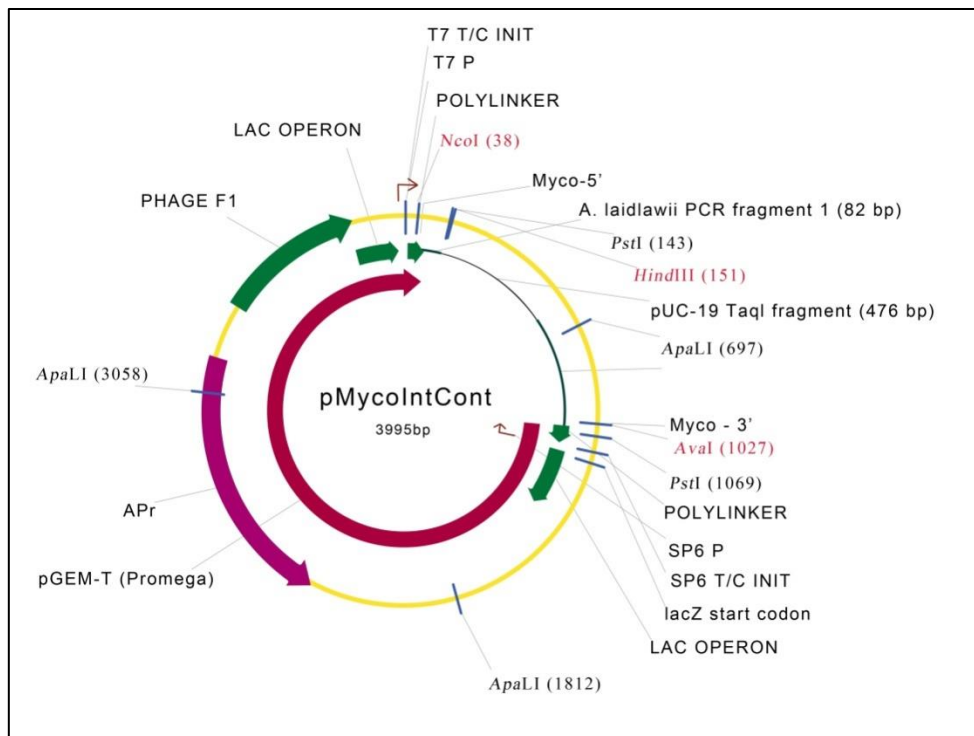


Figura 5: Esquema de plásmido pMycolntCont utilizado como control interno. La construcción del mismo se realizó insertando en un vector T (pGEM-T) un fragmento que será el blanco a amplificar en las PCR (1000 pb totales). El fragmento fue generado a partir de un fragmento de PCR del gen del 16S ARNr de *A. laidlawii* con una secuencia exógena en el medio proveniente del plásmido pUC-19 digerido con la enzima de restricción *Taq* (20).

3.1.2.2. Obtención del control interno

Se realizó una extracción plasmídica a partir de *E.coli* DH5a transformadas con el plásmido pMycolntCont que fueron cedidas amablemente por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay. A partir de un criovial, se realizó el crecimiento durante toda la noche de las bacterias en 30 mL de medio Luria-Bertani con ampicilina 100 µg/mL. Se utilizó el kit comercial, ZR PlasmidMiniprep™- Classic(Zymo Research), y se procedió siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eluyó el ADN con 50 µL de agua estéril.

3.1.2.3. Protocolo de PCR

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL conteniendo dNTP (Bioron) a una concentración final de 0,2 mM cada uno, juego de *primers* descritos en la Tabla 8 a una concentración final de 0,1 µM cada uno, MgCl₂ a una concentración final de 2 mM (Invitrogen), 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) y el amortiguador de reacción aportado por el fabricante (Invitrogen) (ver Tabla 8). El resto del volumen se completó con el ADN molde (muestra o control), pudiendo ser entre 1 µL y 6 µL.

El programa de PCR que se utilizó para la amplificación consta de un paso inicial a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos, extensión de la reacción de polimerización a 72°C por 1 minutos y finalmente un último paso a 72°C por 10 minutos. Se utilizó un termociclador *Littlegenius* (BIOER).

Tabla 8: Cantidades necesarias de cada reactivo para una reacción de PCR. La reacción se completó agregando 4 μL de ADN molde más 2 μL de agua, o 4 μL de ADN molde más 2 μL de control interno, según correspondiera.

Mix PCR	Concentración final	μL por muestra
Buffer 10X	1 X	2,5 μL
dNTPs 10mM c/u	0,2 mM c/u	0,5 μL
Primers 10 μM c/u	0,1 μM c/u	0,25 μL
MgCl ₂ 50mM	2 mM	1 μL
Taq Invitrogen 5U/ μL	1 U	0,2 μL
Agua	ND	14,55 μL
Total		19 μL

3.1.2.4. Muestras procesadas

Se procesaron muestras de diferentes orígenes y procedencia. Por un lado se procesaron muestras celulares provenientes del Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT. Por otro lado, se procesaron muestras provenientes de la colección de investigación y desarrollo de VBUY, la que cuenta con más de 150 cepas (líneas celulares y cepas virales y bacterianas); y es independiente de la colección de cepas para uso industrial. Asimismo se procesó SFB y suero equino mediante esta PCR, y muestras provenientes de lavados pulmonares de ratones.

En paralelo, se seleccionaron algunas de estas muestras para ser enviadas al servicio de detección de micoplasmas brindado por la Unidad de Biología Celular del IPMont.

3.1.2.5. Tratamiento de las muestras para su utilización como molde para PCR

- Muestras de origen celular o lavado pulmonar de ratones

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó esta sección.

- Muestras de origen viral o sueros animales

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó esta sección.

3.1.2.6. Visualización del producto de PCR

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1%, agente intercalante de ADN GoodView (SBS Genetech) a una concentración de 0,02 % v/v, en buffer TAE 0.5 X (TAE 50 X: 242 g de Tris base, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M, pH 8, llevar a volumen de 1 L) (38). Se sembró 10 μL de cada muestra con 2 μL de buffer de corrida de ADN 6X (0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xilencianol, 30 % glicerol en agua) (39) en cada pocillo. En paralelo, se sembró 5 μL del marcador de peso molecular, utilizándose dos diferentes uno de 1 kpb (GeneRuler 1 kb DNA Ladder - Thermo Fisher Scientific) y otro de 100 pb (100 bp plus DNA Ladder *ready-to-use* – BIORON). La corrida electroforética se realizó a 100V durante 40 minutos en buffer de corrida TAE 0.5 X. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador Life Technologies- E-gel Imager.

3.1.3. Aproximación a la validación de la técnica de PCR dentro de VBUY

3.1.3.1. Estudio de la sensibilidad de la PCR

Se cuantificó el pADN del control interno en el equipo Infinite M200 pro (Tecan).

Para el estudio de sensibilidad se realizaron diluciones seriadas del control interno desde puro hasta 1/1.000.000, y se realizó una PCR utilizando estas diluciones como molde según el protocolo descrito en 3.1.2.3. A partir de los resultados obtenidos, se calculó la cantidad mínima de ng detectada por la PCR y la cantidad de bacterias que detecta la PCR mediante la herramienta *Calculator for determining the number of copies of a template* (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>), teniendo en cuenta que los micoplasmas tienen solo una copia del gen del rARN 16S dentro de su genoma. Finalmente el valor se pasó número de bacterias por mL detectadas por la PCR.

3.1.3.2. Estudio de la especificidad de la PCR

A partir de una placa de control ambiental (RODAC) se realizó la toma de muestras con un anza previamente esterilizada, y se resuspendió cada una de ellas en 50 µL de agua estéril. Luego se calentaron estas muestras a 100 °C por 10 minutos y se centrifugaron a 2000 g por 5 minutos. Se recolectaron los diferentes sobrenadantes por separado y se utilizaron como molde para realizar la PCR según protocolo 3.1.2.3.

3.1.3.3. Correlación de la PCR puesta a punto con muestras procesadas por IPMont, y con muestras procesadas por cultivo microbiológico.

Se realizaron los cálculos de correlación entre la PCR de VBUY con los resultados obtenidos previamente por el servicio externo del IPMont y en paralelo con los resultados obtenidos por el cultivo microbiológico. Los datos fueron procesados según el método estadístico de Pearson para variables binarias, según la siguiente fórmula:

$$\phi = \sqrt{\frac{\chi^2}{2}}, \text{ siendo } \chi^2 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \frac{(n_{ij} - \frac{n_{i+}n_{+j}}{n})^2}{\frac{n_{i+}n_{+j}}{n}}$$

En paralelo, también se calcularon los siguientes parámetros estadísticos para la correlación entre la PCR de VBUY y el cultivo microbiológico: porcentaje total de aciertos, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo.

$$\%_{\text{aciertos}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de muestras con mismo resultado por ambos ensayos}}{\text{n}^\circ \text{ total de muestras procesadas}}$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de muestras positivas por PCR}}{\text{n}^\circ \text{ de muestras positivas por microbiológico}}$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de muestras negativas por PCR}}{\text{n}^\circ \text{ de muestras negativas por microbiológico}}$$

3.2. Identificación de especies contaminantes de micoplasmas.

3.2.1. Estudio de las secuencias de micoplasma.

Se realizó un análisis bioinformático molecular con el fin de identificar si las secuencias del 16S del rADN de micoplasmas presentes en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se diferencian lo suficiente para poder clasificar a nivel de especie las posibles muestras positivas encontradas por PCR. En primera instancia, se realizó una búsqueda de todas las secuencias de ADN del rARN 16S de micoplasma presentes en NCBI. Con las secuencias descargadas, se realizó un depuramiento de las secuencias redundantes mediante el programa cd-hit (PID thresholdscut 0.9). Luego se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el programa MSA Clustal Omega, utilizando los parámetros que el programa otorgaba por defecto (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), para así poder determinar y estudiar con mayor

detalle las regiones altamente conservadas y, en caso de existir, la/s región/es variable/s. Se analizaron dichos alineamientos mediante el programa JalView (<http://www.jalview.org/>), y se buscaron las regiones altamente conservadas donde los *primers* hibridan. Luego se buscó la región amplificada por los *primers* utilizados en la PCR utilizando la herramienta Primer Blast (37) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Con la región de interés definida, se realizó el estudio bioinformático en Linux para separar en clusters, mediante la herramienta cd-hit, las diferentes regiones amplificadas con un porcentaje de identidad igual o mayor a 98 %. Se toma este valor debido a que la secuenciación que realizada por la empresa Macrogen tiene un 98 % especificidad.

3.2.2. Secuenciación e identificación de muestras positivas

Se mandaron a secuenciar a la empresa Macrogen muestras que dieron resultados positivos en las diferentes PCR realizadas. Una vez obtenidas las secuencias se realizó un Nucleotide Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) con el fin de identificar la especie contaminante de micoplasma.

3.3. Estudio de la contaminación por *Mycoplasma* de ratones de bioterio

VBUY cuenta con un bioterio el cual se utiliza para realizar diferentes controles biológicos de sus productos terminados y/o semi-elaborados en animales de experimentación. En las instalaciones se encuentran alojados diferentes roedores, como ratones (*Mus musculus*) hámsters (*Mesocricetus auratus*) y cobayos (*Cavia porcellus*). Es un bioterio convencional, ya que no cuenta con las condiciones necesarias para ser catalogado como SPF. Los ratones SPF con los que se trabaja son adquiridos del bioterio de la DILAVE-MGAP, los cuales son otorgados con el certificado libre de microorganismos específicos, incluyendo *Mycoplasma*.

Para este estudio, se seleccionaron nueve ratones vírgenes que cumplían los siguiente criterios: cuatro machos y tres hembras, elegidos al azar, provenientes del bioterio SPF de la DILAVE (MGAP) que habían sido alojados previamente al ensayo durante 30 días en el bioterio convencional de VBUY; y un macho y una hembra provenientes también del bioterio SPF de la DILAVE pero que no habían tenido contacto previo con los animales del bioterio de VBUY. Los animales fueron sacrificados mediante eutanasia por inhalación de CO₂, según el procedimiento detallado de la empresa y en condiciones de cumplimiento del principio de las 3Rs.

3.3.1. Lavado pulmonar

Se procedió a realizar lavados pulmonares de los ratones seleccionados. El procedimiento constó de una desinfección general de la piel del animal con etanol al 70% v/v, donde posteriormente se realizó una incisión disección de la zona central del cuello con instrumental quirúrgico estéril. Posteriormente se inyectaron 0,5 mL de suero fisiológico estéril para realizar el lavado de los pulmones, intentando recuperar la mayor cantidad de muestra sin retirar la aguja.

A la muestra de lavado pulmonar, se le realizó una extracción de ADN por shock térmico (ver sección 3.1.2.6) y luego fue analizada por PCR (ver sección 3.1.2.3).

3.4. Cultivo celular

3.4.1. Línea celular MA104

La línea celular MA104 es una línea adherente de mono que posee un tiempo de duplicación de 27 horas (40). Los viales de células utilizados en este trabajo contaban con controles de

esterilidad, ausencia de micoplasma (resultado IPMont), y trazabilidad de número de pasajes y materias primas de origen animal como ser SFB. Esta línea es susceptible a la infección por RVB.

3.4.2. Cultivo de línea celular MA104

Se cultivó la línea celular MA104 en medio de cultivo mínimo (VBUY) suplementado con 10 % de SFB (Biowest) libre de micoplasma en estufa a 37 °C con atmósfera de 5 % de CO₂. Este procedimiento se hizo siguiendo la misma manipulación aséptica descrita en 3.1.1.1. La monocapa se subcultivó tres veces por semana, sembrando las células en cada pasaje a una dilución ½ respecto a la densidad inicial (densidad final aproximada: 0,2 x 10⁶ células/mL). Las células fueron despegadas utilizando tripsina (Gibco) y el proceso de tripsinización se siguió mediante observación bajo el microscopio. Se tuvo en cuenta no superar los 25 pasajes.

3.4.3. Descongelado de MA104

Se descongelaron las células MA104 provenientes de nitrógeno líquido en baño de agua a 37 °C. Una vez descongeladas, se agregó todo el contenido del criovial a una botella de 25 cm² con medio mínimo suplementado con 10 % de SFB (Biowest). A las 4 horas se observaron las células bajo microscopio, y si estas estaban adheridas a la superficie, se cambió el medio de forma de descartar el DMSO proveniente del medio de congelamiento, el cual es tóxico para las células.

3.4.4. Controles

Se monitoreó la contaminación por micoplasma de los cultivos celulares cada dos semanas utilizando la metodología descrita en 3.1.2.

Además, se realizaron controles de esterilidad para otros microorganismos utilizando el medio líquido tioglicolato (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US), medio líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*- Becton, Dickinson and Company, New Jersey, US) y medio sólido agar Sabouraud (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US). Se utilizaron 10 mL de cada medio que fueron inculados con 500 µL de la suspensión celular. Cada tubo se incubó durante 14 días con observaciones diarias. Se consideró la muestra como estéril cuando no se observó crecimiento en ninguno de los tubos sembrados. Estos medios vienen previamente validados por el departamento de Control de Calidad.

3.5. Cultivo viral

3.5.1. Cepa de RVB

Se utilizaron dos cepas de RVB (RVB-1 y RVB-2) las cuales se encontraban contaminadas con micoplasma. Los RVB son un género dentro de la familia Reoviridae. Los viriones miden aproximadamente 75 nanómetros de diámetro. Causan un ECP en las células que infectan el cual es muy característico: células redondeadas y desprendimiento de la monocapa (41).

3.5.2. Cálculo de volumen de inóculo para infección mediante MOI

La infección de las células MA104 por el RVB se realizó mediante una MOI=0,1. La MOI es el índice de multiplicidad y hace referencia al número de partículas virales que son agregadas por número de células durante la infección.

Con el fin de conocer el volumen de virus necesario para infectar (inóculo), en cada pasaje se deja una botella exclusivamente para realizar un recuento celular (cámara de Neubauer, azul

de tripán al 50 % en la muestra) de manera de estimar el número de células presentes en todas las botellas de ese pasaje que se van a utilizar para las infecciones (condiciones, controles, etc). Y este número se utiliza como *N° de cels* en la siguiente fórmula:

$$\text{Vol de virus (mL)} = \frac{N^{\circ} \text{ de cels} * \text{Vol de cels (mL)} * \text{MOI}}{TCID_{50}}$$

3.5.3. Cultivo RVB

El cultivo de RVB se realizó siguiendo la manipulación aséptica descrita en 3.1.1.1. Se preactivó el virus con tripsina (Gibco) a una concentración de 10 µg/mL durante 30 minutos. Luego se inoculó la cepa viral con una MOI entre 0,01 y 0,1 (Paso 1, Figura 6), en botellas de 25 cm² con monocapa de MA104. Se infectaron las botellas necesarias en cada caso agregando medio de infección el cual se compone de medio mínimo (VBUY) con 1 µg/mL de tripsina (42).

El cultivo se dejó en estufa a 37 °C con atmósfera de 5 % de CO₂ durante 5 días, monitoreándolo diariamente bajo el microscopio para la detección de ECP característico (Paso 2, Figura 6).

3.5.4. Congelado y descongelado de RVB

Una vez observado el ECP en toda la monocapa, se procedió a congelar el RVB a -20 °C (Paso 3, Figura 6). A las 48 hs se descongeló y se pasó el contenido a un tubo falcon para clarificarlo a 2000 g por 5 minutos (Paso 4, Figura 6). Luego se alicuotó todo el contenido del tubo en criotubos de 1,2 mL, y se congeló a -80 °C (Paso 5, Figura 6).

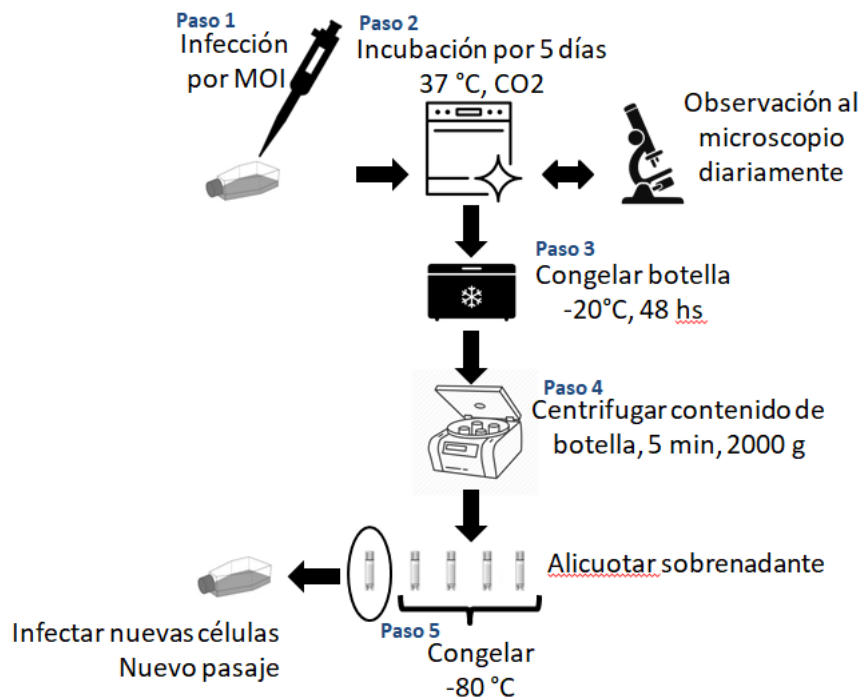


Figura 6: Esquema de los pasos llevados a cabo en cada pasaje viral de RVB.

3.6. Titulación de RVB mediante TCID₅₀

Se determinó el título viral del RVB por TCID₅₀ de acuerdo al POE del Departamento de Investigación y Desarrollo de VBUY. Se utilizó para esto placas de 96 pocillos las cuales fueron sembradas 48 horas antes de la infección con una suspensión de $0,2 \times 10^6$ células/mL. A las diferentes muestras a titular se les realizó diez diluciones seriadas en base 10, desde 10^{-1} hasta 10^{-10} . Luego se sembró ocho pocillos por cada dilución con un volumen de dilución viral igual al volumen de células (100 µL). Se dejó incubando las placas a 37 °C con atmosfera de 5 % de CO₂ durante 5 días. Bajo microscopio, se observó y registró los pocillos que presentaban ECP, a partir de lo cual se determinó el título utilizando el método estadístico de Spearman y Kärber (42).

3.7. Eliminación de la contaminación de micoplasma a partir de un cultivo de RVB infectado (RVB-1)

3.7.1. Toxicidad de antibiótico sobre la línea celular MA104

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó esta sección.

3.7.2. Puesta a punto del protocolo de descontaminación

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó esta sección.

3.8. Generación de un banco de desarrollo a partir de la cepa de RVB-2 descontaminada.

3.8.1. Escalado de las células

Por cuestiones de confidencialidad se eliminaron partes de esta sección.

3.8.2. Preparación del granel y envasado

Por cuestiones de confidencialidad se eliminaron partes de esta sección.

3.9. Evaluación de la contaminación ambiental por *Mycoplasma*

3.9.1. Control de la contaminación por *Mycoplasma*

Como parte del control ambiental de la cabina de flujo laminar que se utilizó para el desarrollo de esta tesis se agregó un control para *Mycoplasma*. Para ello se procedió a plaquear en la cabina el medio de cultivo específico descrito en 3.3.1 en dos placas, las cuales se dejaron destapadas mientras el agar solidificaba. Luego se dejaron incubando por 3 semanas en cámara anaerobia. Al finalizar estas semanas se las observó en microscopio (40 X); la presencia de al menos una colonia típica de *Mycoplasma* se considera un resultado positivo para contaminación por *Mycoplasma*.

3.9.2. Desinfección ambiental de *Mycoplasma*

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó esta sección.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Puesta a punto de una PCR para la detección de *Mycoplasma* spp.

4.1.1. Ajuste de los parámetros de la técnica de PCR y correlación de resultados con un servicio externo

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó contenido de este apartado.

Para el ajuste inicial de todos los parámetros de la PCR, se utilizaron los reactivos enviados por el Dr. Uphoff (DSMZ). Desde el Instituto Leibniz-DSMZ se envió un tubo con un control positivo para la PCR, el cual era el ADN precipitado de un cultivo de *Mycoplasma*; y un segundo tubo con el control interno, el cual ya se explicó en la sección 3.1.2.1. El envío no detallaba concentraciones, pero sí diluciones de uso recomendadas (en ambos casos era de 1/10 o mayor). El tamaño esperado del amplicón para el control positivo es de aproximadamente 500 pb, mientras que para el control interno de aproximadamente 1000 pb debido al inserto que presenta la secuencia.

Para el diseño del protocolo de la PCR se siguieron las recomendaciones detalladas por Uphoff en sus numerosos trabajos al respecto (7, 16, 17, 18, 20), incluyendo algunas modificaciones para adaptarse a la *Taq* polimerasa que se utilizó en este trabajo, diferente a la utilizada en los protocolos de Uphoff. Se realizaron diluciones seriadas en base 10 del control positivo y del control interno, brindados por Uphoff, desde 1/10 hasta 1/10.000, las que fueron incluidas como ADN molde para la puesta a punto de la PCR.

En la Figura 8, se muestra el resultado de la PCR realizada con los reactivos de Uphoff. Se puede observar que fue posible amplificar tanto el control positivo (carril 4 y 7, aprox. 500 pb) como el control interno (carril 8, aprox. 1000 pb) a la dilución recomendada por el Uphoff (1/10). Este resultado mostró que se pudo reproducir con algunas modificaciones el protocolo reportado por Uphoff con resultados concordantes (18).

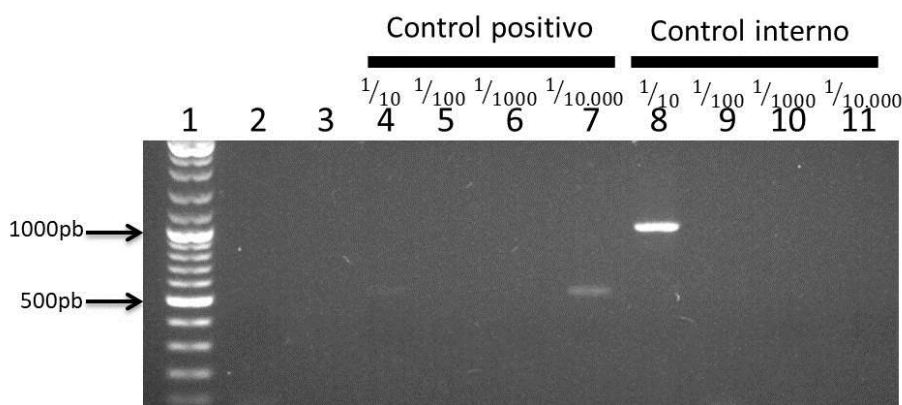


Figura 8: Resultados de la PCR realizada con reactivos de Uphoff usando como ADN molde los controles positivo e interno. Carril 1: PM 1 kpb, 2: control negativo, 3: vacío, 4-7: diluciones seriadas al décimo del control positivo, 8-11: diluciones seriadas al décimo del control interno 1/10.

En la Figura 8, se observa que fue posible amplificar el control positivo a una dilución de 1/10 y 1/10.000 (carril 4 y 7 respectivamente), pero luego en las diluciones 1/100 y 1/1000 no hay amplificación (carril 5 y 6). Se piensa que esta inconsistencia en los resultados pueda ser debida a algún error durante la PCR para las condiciones de las diluciones 1/100 y 1/1000,

pero lamentablemente no se contaba con material extra como para repetir el análisis de estas diluciones.

Para poder trabajar de forma independiente de los reactivos provistos por el laboratorio de referencia para *Mycoplasma*, se decidió generar unos propios. Para el control positivo se seleccionó una muestra de sobrenadante viral positiva (V1) de la cual se tiene en cantidad suficiente, para 500 reacciones. Para la generación del control interno se contaba con *E. coli* DH5 α transformadas previamente con el plásmido conteniendo el fragmento correspondiente al control interno. A partir de las bacterias transformadas se realizó una purificación de ADN plasmídico obteniéndose 5000 ng totales de ADN. La preparación fue llevada a la misma concentración que la muestra enviada por el equipo de trabajo de Uphoff, por aproximación de intensidad de banda, de manera de poder continuar utilizando la misma concentración, lo cual aseguró un rendimiento de un millón de reacciones.

Al comenzar a analizar muestras celulares y virales en la PCR, la no amplificación del control interno (no se observaba la banda de 1000 pb en los geles) dejó en evidencia muchas veces la presencia de inhibidores de la PCR que pueden provenir de las células (endonucleasas o proteína K, datos no mostrados). Si bien al seguir aumentando las diluciones se logra revertir la inhibición a partir de 1/1.000, al ser diluciones tan grandes de la muestra se puede estar comprometiendo la sensibilidad de la técnica. Sumándose a todo esto, a veces los micoplasmas pueden encontrarse alojados dentro de las células que se quieren analizar, por lo que sin un tratamiento previo de las mismas, se puede estar pasando por alto la contaminación (falso negativo). Por este motivo, fue necesaria la inclusión de un tratamiento previo a la PCR. Para el caso de muestras de origen celular, fue suficiente la inclusión de un paso de shock térmico para la liberación del ADN. Para facilitar el procesamiento de las muestras, se realizó un ensayo donde se determinó que una dilución 1/10 es la adecuada para obtener buenos resultados en la PCR (datos no mostrados). Por otro lado, para las muestras virales fue necesaria la incorporación de una metodología de purificación de ADN por extracción con fenol/cloroformo y posterior precipitación con etanol absoluto para poder revertir la inhibición, ya que la inclusión del paso de shock térmico no fue suficiente para lograrlo. Para facilitar el procesamiento de las muestras, se realizó un ensayo donde se determinó que para obtener buenos resultados en la PCR hay que ensayar la muestra pura y una dilución 1/10 de la muestra (datos no mostrados). Si bien la inclusión de un paso de purificación agrega complejidad a la técnica, la cual se pretende que sea sencilla y económica, se seleccionó la extracción con fenol/cloroformo, la cual no implica un gran costo ni un tiempo de procesamiento de las muestras excesivo comparando con el shock térmico (4 horas de procesamiento frente a 15 minutos del shock térmico).

A continuación, se procedió a analizar mediante la misma PCR un conjunto de 22 muestras provenientes de VBUY o de Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay. De la mayor parte de las muestras elegidas se conocía su estatus de contaminación para micoplasma, ya que habían sido analizadas previamente por el servicio de detección de micoplasma brindado por la Unidad de Biología Celular del IPMont. Se seleccionaron 2 cultivos celulares negativos y 3 positivos; 5 sobrenadantes virales negativos y 7 positivos; 4 sobrenadantes celulares de los cuales se desconocía su estatus, y un sobrenadante viral sin estatus (Total: 22 muestras).

Todos los resultados obtenidos a partir de las 22 muestras se presentan en las Figuras 9 y 10 y la Tabla 9. Con las modificaciones incluidas para el procesamiento de muestras, fue posible amplificar correctamente el control interno en todas ellas (Figura 9 y 10).

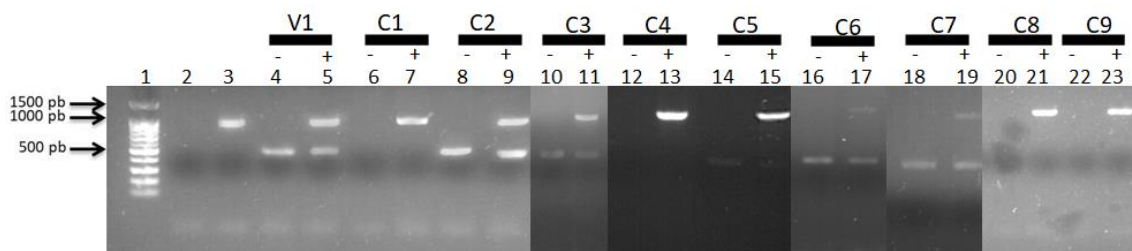


Figura 9: Resultados de PCR de las diferentes muestras celulares. Carril 1: PM 100 pb, 2: control negativo, 3: control interno (CI), 4: control positivo V1, 5: control positivo V1 + CI, 6: C1, 7: C1 + CI, 8: C2, 9: C2 + CI, 10: C3, 11: C3 + CI, 12: C4, 13: C4 + CI, 14: C5, 15: C5 + CI, 16: C6, 17: C6 + CI, 18: C7, 19: C7 + CI, 20: C8, 21: C8 + CI, 22: C9, 23: C9 + CI.

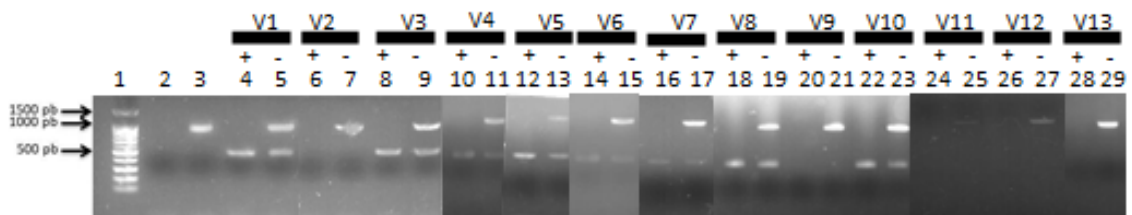


Figura 10: Resultados de PCR de las diferentes muestras virales. Carril 1: PM 100 pb, 2: control negativo, 3: control interno, 4: control positivo V1, 5: control positivo V1 + CI, 6: V2, 7: V2 + CI, 8: V3, 9: V3 + CI, 10: V4, 11: V4 + CI, 12: V5, 13: V5 + CI, 14: V6, 15: V6 + CI, 16: V7, 17: V7 + CI, 18: V8, 19: V8 + CI, 20: V9, 21: V9 + CI, 22: V10, 23: V10 + CI, 24: V11, 25: V11 + CI, 26: V12, 27: V12 + CI, 28: V13, 29: V13 + CI. CI: control interno.

Tabla 9: Resultados de estatus de contaminación por micoplasma evaluado por la PCR puesta a punto en este trabajo y por el IPMont. NE: No ensayado. Cx es el código que hace referencia a las muestras de origen celular mientras que Vx a las de origen viral.

Código de muestra	Procedencia	Resultado Tesis	Resultado IPMont
Muestras celulares			
C1	VBUY	Negativo	Negativo
C2	VBUY	Positivo	Positivo
C3	VBUY	Positivo	NE
C4	VBUY	Negativo	Negativo
C5	VBUY	Positivo	Positivo
C6	ORT	Positivo	Positivo
C7	ORT	Positivo	NE
C8	ORT	Negativo	NE
C9	ORT	Negativo	NE
Muestras virales			
V1 (control positivo de la PCR)	VBUY	Positivo	Positiva
V2	VBUY	Negativo	Negativo
V3	VBUY	Positivo	Positivo
V4	VBUY	Positivo	Positivo
V5	VBUY	Positivo	Positivo
V6	VBUY	Positivo	Positivo
V7	VBUY	Negativo	Negativo
V8	VBUY	Positivo	Positivo
V9	VBUY	Negativo	Negativo
V10	VBUY	Positivo	Positivo
V11	VBUY	Negativo	Negativo

V12	VBUY	Negativo	Negativo
V13	VBUY	Negativo	NE

Los resultados obtenidos mediante esta PCR fueron concordantes con los obtenidos por el servicio del IPMont (ver Tabla 9). Esto resulta en un total de 17 muestras analizadas por ambas PCRs, donde en todos los casos se obtuvieron los mismos resultados tanto en VBUY como en el IPMont, demostrando la confiabilidad de los resultados obtenidos por el método puesto a punto dentro de VBUY. La correlación entre ambas metodologías fue positiva perfecta para el número de datos analizados (coeficiente de correlación *phi* de Pearson $\phi=1$). Sería interesante poder contar con más datos de análisis de muestras que presenten resultados del servicio del IPMont, para aumentar el número de muestras procesadas por ambos laboratorios.

Por otro lado, para probar la PCR con otro tipo de muestras, se controlaron diferentes sueros de origen bovino fetal o equino (irradiados y filtrados). Si bien todos los sueros empleados dentro de VBUY vienen con certificado de análisis donde se detalla que están libres de micoplasma; se quiso poner a punto la técnica para su implementación como control de rutina. Los sueros son muestras complejas con uno alto contenido proteico y por tanto presentaron inhibición de la PCR. Se debieron ensayar varias condiciones diferentes para el procesamiento de las muestras previamente a la PCR. Todos los sueros analizados (n=3) dieron un resultado negativo frente a la presencia de micoplasma, resultado esperado según los certificados entregados por los fabricantes. Una de las muestras de suero fue enviada a analizar al IPMont, obteniéndose también un resultado negativo.

Por todos los resultados presentados (Figuras 8, 9 y 10 y Tabla 9), se puede afirmar que fue exitosa la puesta a punto de la PCR para la identificación de la contaminación por micoplasma en muestras provenientes de cultivos celulares, cultivos virales y otras materias primas como sueros animales. Con todo lo realizado, fue posible escribir un POE interno a VBUY para la detección de micoplasma por PCR en muestras virales y/o celulares. Esto permitirá la implementación del ensayo por parte del sector de Investigación y Desarrollo, así como la inclusión a futuro de este ensayo dentro del portafolio de ensayos del sector de Control de Calidad de la empresa.

4.1.2. Determinación del límite de detección y especificidad de la técnica de PCR

Dentro de los parámetros más críticos que determinan el desempeño de una técnica de detección se encuentran su sensibilidad y su especificidad. Para este caso en particular, el primero de estos parámetros hace referencia a la cantidad mínima de micoplasmas que la PCR es capaz de detectar en una muestra (límite de detección, LOD); y por lo tanto refiere al poder de la técnica en ser capaz de detectar contaminaciones con bajos niveles de micoplasmas (sin falsos negativos). El segundo de los parámetros, especificidad, indica la capacidad del ensayo para dar como casos negativos los ensayos realizados sobre muestras que poseen ADN proveniente de otros microorganismos (no hay falsos positivos), y da una idea de cuán específicos son los *primers* utilizados para reconocer micoplasma exclusivamente. La determinación de estos dos parámetros consiste en una primera aproximación para comenzar con la validación de la técnica de PCR.

Para el ensayo del LOD se tomó el control interno generado en VBUY y se le realizaron diluciones seriadas desde la muestra puro (100 ng/ μ L) hasta 1/1.000.000. Es importante recalcar que se trabajó con ADN plasmídico y no ADN genómico de micoplasma propiamente dicho, que hubiera sido la aproximación más correcta para este ensayo; ya que no se cuenta dentro de la empresa con una cepa de referencia para utilizar como control positivo de micoplasma.

El control interno logra amplificarse hasta una dilución de 1/500.000, dejándose de observar la banda de 1.000 pb a una dilución de 1/1.000.000 (Figura 11). Dada la concentración inicial del control, esta dilución implica que la mínima cantidad de ADN plasmídico detectada por este ensayo de PCR es menor que 0,4 pg. Esto equivale aproximadamente a $3,71 \times 10^5$ copias de ADN (utilizando la fórmula provista por <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>).

Dado que el genoma de micoplasma presenta típicamente una única copia del gen del 16S por genoma, podríamos hacer una extrapolación y decir que se podrían estar detectando al menos $3,71 \times 10^5$ bacterias por reacción de PCR o lo que es lo mismo $1,55 \times 10^7$ bacterias/mL.

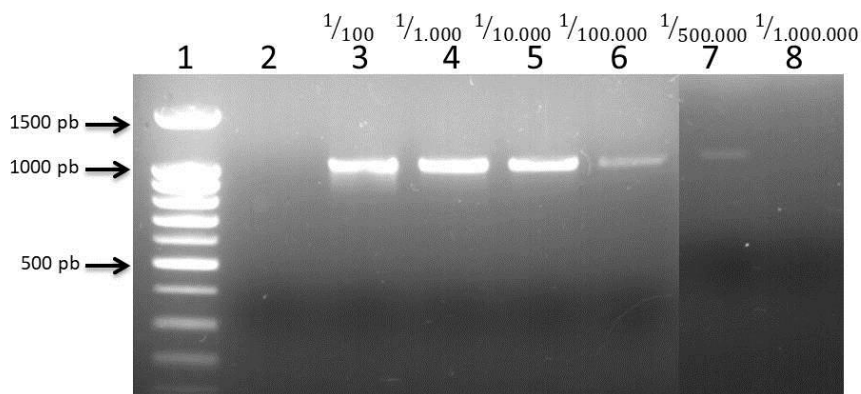


Figura 11: Resultados de PCR de diluciones seriadas del control interno obtenido a partir de la miniprep del plásmido pMycolntCont. Carril 1: PM 100 pb, 2: agua, 3-8: diluciones seriadas de control interno. Se observa amplificación hasta la dilución 1/500.000

Esta sensibilidad no es excelente, pero se piensa es suficiente para detectar contaminaciones en cultivo las cuales se encuentran en el entorno de 10^8 - 10^9 ufc/mL (20). Si se quisiera trabajar para aumentar la sensibilidad se podrían ajustar los parámetros de la presente PCR para hacerla más sensible (modificaciones en el protocolo de PCR, Taq más eficiente). Asimismo, el LOD del ensayo está directamente vinculado con la sensibilidad del método para visualizar el ADN. El agente intercalante utilizado en este trabajo (GoodView) tiene un LOD de 100 ng de ADN, bastante menor en comparación con el bromuro de etidio que presenta una sensibilidad de 1 ng, o incluso las sondas fluorescentes, que están en el entorno de los pg de ADN. (44, 45). Por lo tanto una modificación muy simple del protocolo como cambiar el agente intercalante, podría mejorar la LOD de 10^7 a 10^5 bacterias/mL. Otra opción podría ser realizar una PCR en tiempo real, la cual en la literatura muestra que tiene mejor sensibilidad, llegando a detectar un mínimo de 400 copias de ADN (46). Si bien existen modificaciones sencillas que se pueden introducir a la técnica puesta a punto en este trabajo (ej. cambio tinción del ADN); se cree que con las herramientas disponibles se pudo desarrollar una técnica capaz de detectar correctamente las contaminaciones por micoplasma presentes en cultivo.

Para el estudio de la especificidad de la PCR, se seleccionaron diferentes muestras provenientes de placas de muestreos ambientales realizados por el sector de Control de Calidad de VBUY (Figura 12). Estas incluían a microorganismos de las especies *Bacillus* spp. y *Staphylococcus* spp. Se eligió esta estrategia para tratar de abarcar los microorganismos más comúnmente presentes en el ambiente, que serían los que más probabilidad tendrían de aparecer como contaminaciones en cultivos celulares o virales. Se procesaron las muestras de las colonias siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.1.3.2.

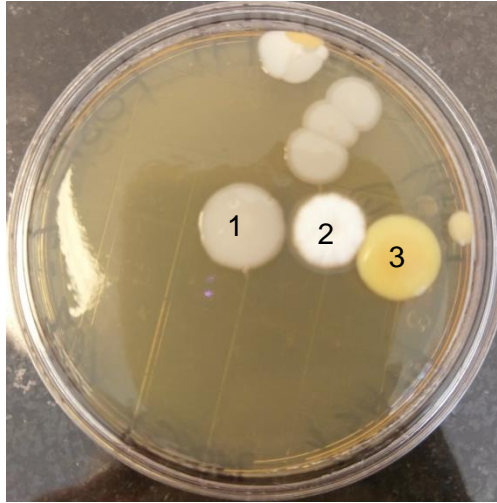


Figura 12: Placa RODAC de control de contaminación ambiental que fue utilizada para tomar muestras de otros microorganismos para los estudios de especificidad de la PCR para micoplasma. Se tomaron tres muestras desde las colonias indicadas en la imagen (1-3). Muestra 1: *Bacillus* spp, muestras 2 y 3: *Staphylococcus* spp.

Una vez analizadas las muestras de los tres microorganismos provenientes de la placa RODAC mediante PCR, se pudo constatar que ninguna de ellas presentó amplificación de la banda de 500 pb, correspondiente a un positivo para micoplasma (Figura 13). Sin embargo todas las muestras amplificaron la banda del control interno, lo que indica que las muestras no presentaron inhibición de la reacción de PCR. Estos resultados nos permiten afirmar que la PCR utilizando este sets de *primers* es suficientemente específica para micoplasma respecto a otros contaminantes bacterianos típicos, que suelen encontrarse en el ambiente de trabajo.

Para poder concluir que la PCR es totalmente específica para micoplasma, sería conveniente realizar el ensayo incluyendo muestras de bacterias estrechamente relacionadas con el género Mollicutes. Este trabajo fue realizado por Whirth *et al.* para el mismo juego de *primers* que se utilizó en este trabajo y los resultados fueron negativos para todas las muestras analizadas dentro de las que se incluían las especies: *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Saccharomyces cerevisiae* (3).

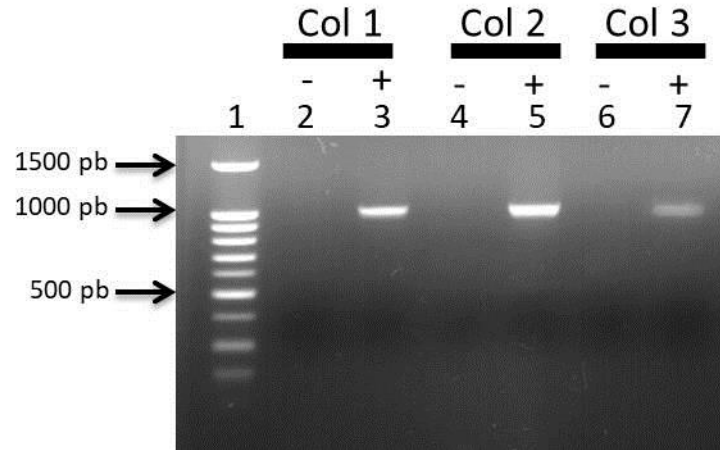


Figura 13: Resultados de PCR para el ensayo de especificidad realizado utilizando muestras provenientes de las 3 colonias (Col1, Col2 y Col 3) provenientes de la placa RODAC. Carril 1: PM 100pb, carriles 2, 4, y 6: muestras sin CI, carriles 3,5,7: muestras con CI. CI: control interno

4.1.3. Correlación de resultados de la PCR puesta a punto en VBUY con la metodología de cultivo en placa

Luego de haber podido determinar que la PCR puesta a punto fue capaz determinar correctamente el estatus de contaminación de muestras virales y celulares de las que se sabía si eran positivas o negativas, con una sensibilidad y especificidad aceptables, el siguiente paso fue poder determinar si esta metodología era capaz de mostrar resultados que pudiesen ser correlacionables con los obtenidos por la metodología de cultivo microbiológico (CFR).

En primer lugar, se procedió a la puesta a punto del proceso de cultivo microbiológico para el crecimiento de micoplasma. Para ello fue necesario probar el medio de cultivo, los suplementos y las condiciones de crecimiento óptimas tomando como base el protocolo descrito en la norma estadounidense CFR. Si bien la literatura sugiere la utilización exclusiva de suero equino como suplemento para el crecimiento de este organismo, en este trabajo se pudo demostrar que el SFB cumple con los requerimientos para el crecimiento adecuado de micoplasma, algo que no se encuentra reportado en la literatura. En este ensayo, se exige que se prueben la siembra directa en placa con agar, y la siembra en caldo de enriquecimiento y luego pasajes al agar cada 4 días durante dos semanas en anaerobiosis (ver Figura 1, pág. 17); la lectura de placas ha de realizarse a los 14 días de la siembra de cada placa. Este procedimiento se debe aplicar a la muestra a ensayar así como a controles positivo y negativo.

Este protocolo contempla que si no hay crecimiento de colonias en la siembra directa a placa, que puede ser debido a la poca carga de micoplasma en la muestra, el paso de cultivo previo en caldo enriquezca la muestra y así pueda verse crecimiento de colonias en las placas realizadas posteriormente, evitando así falsos negativos.

Entonces, para la puesta a punto, se utilizó la misma muestra viral positiva V1 utilizada para la PCR, y posteriormente se incluyeron otras muestras provenientes del conjunto de muestras ensayadas por la PCR (3.1.2, pág. 26). Los resultados indicaron que no fue necesario el paso de enriquecimiento en caldo de cultivo para esta muestra analizada, ya que en todos los casos se pudieron observar colonias en las placas a partir de los 7-15 días post-sembrado. Dado que el tiempo de espera es considerablemente largo para poder decir si una muestra es negativa - al menos treinta días- la exclusión de ese paso acortó el ensayo en al menos siete días. De

encontrar resultados no concordantes con la PCR se propone implementar el paso de crecimiento en caldo antes de realizar el cultivo en placa.

Hubiera sido deseable poder adquirir cepas de referencia para diferentes especies de micoplasma, al menos de aquéllas que aparecen como contaminantes más frecuentes para utilizar como control positivo, y así asegurar que la metodología desarrollada es capaz de permitir su correcto crecimiento y por tanto su detección. El poder contar con estas cepas hubiese sido ideal para el desarrollo de controles positivo, no sólo para el método microbiológico sino también para la PCR.

Finalmente se procedió a redactar un POE para la detección de micoplasma mediante cultivo microbiológico con su respectivo registro, ambos disponibles para su uso dentro de VBUY.

Para el estudio de la correlación entre ambas técnicas, se seleccionó un total de 13 muestras, para las que ya se contaba con el resultado de PCR (ver Tabla 10). Con esta selección se trató de abarcar la mayor diversidad posible de muestras negativas y positivas, muestras celulares o virales, diferentes orígenes (bovino, canino, etc).

Como primer paso, se tomó 200 μ L de cada muestra y se los sembró en una placa conteniendo el medio de cultivo para micoplasma, incubándolas posteriormente en una cámara de anaerobiosis a 37 °C durante tres semanas. Finalizado el tiempo de incubación, se observaron las placas bajo microscopio y en caso de detectarse colonias típicas de micoplasma (Figura 14), se procedió al recuento total de las colonias en cada una de ellas (ver Figura 14). Asimismo, se incluyó en el ensayo un control negativo (agua) y un control positivo (V1).

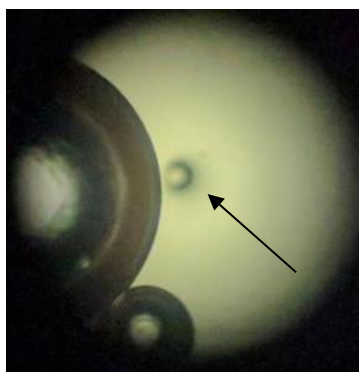


Figura 14: Microscopía óptica de colonia de *Mycoplasma*, tomada durante el desarrollo de la tesis, que presenta la típica forma de "huevo frito" (40X), al lado de ésta se pueden ver burbujas en el agar del medio de cultivo.

Tabla 10: Resultados del cultivo microbiológico de diferentes muestras comparado con el obtenido por PCR como parte de la validación de esta última. (V: cultivo viral, C: cultivo celular). En negrita se destaca el único resultado encontrado no concordante.

Muestra	Resultado PCR	Resultado microbiológico	Número de colonias
V1	Positivo	Positivo	32
V2	Negativo	Negativo	0
V3	Positivo	Positivo	39
V4	Positivo	Positivo	40
V5	Positivo	Positivo	27
V6	Negativo	Negativo	0
V7	Positivo	Positivo	30
V8	Positivo	Positivo	25
V9	Negativo	Negativo	0
V10	Positivo	Positivo	38
V13	Negativo	Positivo	32
C1	Negativo	Negativo	0
C2	Positivo	Positivo	36

Como se muestra en la Tabla 10, a partir de 13 muestras analizadas, 4/13 fueron resultados negativos por ambas metodologías (31 %) y 8/13 fueron resultados positivos por ambas metodologías (62 %); obteniéndose un porcentaje total de aciertos de 93%. Comparando este resultado con el de Uphoff (18) que es de 92 % vemos que nuestro ensayo tiene una muy buena exactitud. Por otro lado, 1/13 muestras dio un resultado negativo por PCR pero positivo por ensayo microbiológico (7 %). Sin embargo no se estuvo ante ningún caso de PCR positiva y cultivo microbiológico negativo. El único caso no concordante podría ser debido a que no se está observando una especie de *Mycoplasma* spp. en la placa, sino otro género dentro de la clase de Mollicutes, los cuales crecen de forma similar que *Mycoplasma* en las placas pero no logran ser amplificadas por la PCR desarrollada por Uphoff (3).

Se obtuvo una buena correlación entre ambos métodos, siendo el coeficiente de Pearson $\phi=0.84$ mientras que la correlación obtenida en el trabajo de Uphoff *et al.* es de 0.74 (18), la diferencia entre ambos valores puede ser debida principalmente al número mayor de muestras que se procesaron en el trabajo del grupo de Uphoff, de casi 500 frente a las 13 de este trabajo. Sin embargo, el valor obtenido en este trabajo muestra que ambos métodos tienen un alto grado de asociación y podría reemplazarse uno por el otro con buenos resultados. El valor predictivo positivo en este trabajo y en el de Uphoff *et al.* dan 100 % y 70 % respectivamente, y el predictivo negativo da 89% y 98 % respectivamente. La diferencia entre los valores puede atribuirse nuevamente a la poca cantidad de muestras procesadas. Es por esto que sería conveniente poder analizar un mayor número de muestras por ambas metodologías. El hecho de que la técnica microbiológica implique una incubación durante casi un mes de las placas, sumado a la lectura engorrosa de las placas para poder detectar colonias de micoplasma, fue lo que impidió poder sumar más muestras en el contexto de esta tesis.

Los resultados obtenidos en esta tesis son respaldados por toda la información disponible en la bibliografía (2, 3, 4, 17, 18, 20, 29), la que recomienda el reemplazo de la metodología actual por el método de PCR para detección de micoplasma. Este es un método más económico, significativamente más rápido y más sencillo que el método microbiológico. Sin embargo sería ideal seguir analizando sistemáticamente muestras futuras por ambas metodologías para continuar enriqueciendo la correlación, y poder contar con un valor de correlación estadística más potente que sirva frente a la validación del ensayo dentro de VBUY.

4.2. Identificación de especies contaminantes de micoplasma

4.2.1. Análisis previos

Uno de los objetivos de este trabajo consistió en identificar la especie de micoplasma presentes en muestras contaminadas positivas por PCR. El hecho de poder ser capaces de detectar la especie del microorganismo puede dar indicios sobre el origen de la fuente de contaminación de manera de poder tomar medidas correctivas o preventivas.

La PCR utilizada en esta tesis amplifica un fragmento del gen ribosomal 16S de micoplasma, que es muy conservado (12). La pregunta entonces fue si a partir del fragmento amplificado por PCR de este gen era posible encontrar diferencias en las secuencias que permitiesen identificar la especie de origen de la contaminación. Para contestar esta pregunta, se realizó una búsqueda de secuencias de ADN del gen ribosomal 16S de micoplasma en la base de datos del NCBI. Se descargaron 11.657 secuencias, a las que se les realizó un depuramiento de secuencias redundantes mediante cd-hit (PDI threshold 0.9); obteniendo un total de 312 secuencias no redundantes. A partir de éstas, se realizó un alineamiento múltiple con el programa MSA Clustal Omega para determinar y estudiar con mayor detalle las regiones altamente conservadas y, en caso de existir, la o las regiones variables. Se estudiaron las diferentes regiones mediante el programa Jalview.

De las 312 secuencias depuradas, la mayoría tenían un tamaño aproximado de 1.500 pb, acorde a lo reportado en la bibliografía (47), no todas las secuencias con las que se trabajó eran completas pero se continuó el análisis de igual forma con las 312 ya que aún podrían contar con la región que amplifican los *primers*. Fue importante asegurarse que dentro de todas las secuencias encontradas estuvieran representadas las especies *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. arginini*, *A. laidlawii* y *M. hominis*, ya que son las que infectan cultivos celulares con mayor frecuencia y por lo tanto las que posiblemente se esperaba encontrar en nuestras muestras (18).

En la Figura 15, se muestran los alineamientos de secuencia de las especies más comunes donde se pudo observar dos regiones altamente conservadas cercanas a los 500 pb y 1000 pb. Estas regiones fueron justamente las utilizadas para el diseño de los *primers Forward* y *Reverse*, respectivamente.

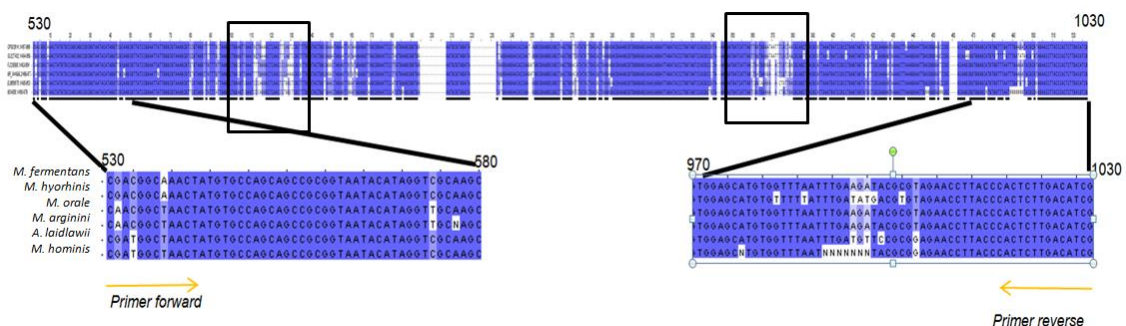


Figura 15: Alineamiento parcial de las secuencias del gen rARN 16S de *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. arginini*, *A. laidlawii* y *M. hominis* realizado mediante el MSA Clustal Omega visualizado en Jalview (color azul oscuro más de 80 % de identidad, color azul entre 80 y 60 % de identidad, color celeste entre 40 y 60 % de identidad). Se muestra el alineamiento a partir de la base 530 hasta la 1030 correspondientes a la secuencia de 500 pb amplificada por la PCR. En amarillo se señalaron las regiones donde hibridan los *primers*. Los recuadros negros muestran las regiones hipervariables dentro del amplicón.

Por otro lado, mediante la herramienta PrimerBLAST se delimitó dentro del alineamiento, la región amplificada por los *primers* de la PCR. A partir de esta región y utilizando las 312

secuencias con las que se estaba trabajando, se realizó un estudio bioinformático en Linux para identificar grupos o *clusters* de especies de micoplasma que presentasen un 98 % de identidad entre sus secuencias, obteniéndose un total de 91 *clusters*.

Al estudiar con mayor detalle los *clusters*, se pudo observar en primer lugar que estos agrupaban secuencias redundantes de la misma especie. Por otro lado, las seis especies más comunes contaminantes de cultivos se pudieron separar perfectamente en *clusters* diferentes (ver Figura 16). Estos resultados indican que frente a una secuencia desconocida proveniente del producto de PCR, las diferencias de secuencia del amplicón permitirían identificar la especie de micoplasma contaminante, o al menos clasificarla en alguno de los 91 *clusters* generados.

```

>Cluster 2
0 520aa, >AB353273.1... * ← M. orale
>Cluster 4
0 520aa, >AP014657.1... *
1 520aa, >EU859975.1... at 98.65%
2 520aa, >LC158832.1... at 99.42% ← M. arginini
3 520aa, >NR_024979.1... at 98.46%
4 520aa, >NR_029183.1... at 98.27%
>Cluster 10
0 518aa, >EU644475.1... at 98.46%
1 520aa, >GU905028.1... * ← M. hominis
2 520aa, >NR_024978.1... at 98.27%
3 518aa, >Subject_1... at 98.46%
4 518aa, >Subject_2... at 98.46%
>Cluster 19
0 519aa, >M24659.1... * ← M. orale
>Cluster 27
0 518aa, >CP002458.1... *
1 518aa, >FJ226565.1... at 99.81% ← M. fermentans
2 518aa, >NR_044666.2... at 99.42%
>Cluster 28
0 518aa, >CP002669.1... * ← M. hyorhinis
1 518aa, >CP003914.1... at 99.23%

```

Figura 16: *Clusters* generados a partir de la secuencia que amplifican los *primers* de la PCR para las especies de micoplasma que aparecen con mayor frecuencia como contaminantes dentro de un laboratorio.

4.2.2. Secuenciación de productos de PCR positivos para contaminación

Se enviaron a secuenciar siete muestras positivas obtenidas mediante PCR a la empresa Macrogen Inc. (ver Tabla 11).

Estas secuencias se analizaron mediante la herramienta Nucleotide Blast y se compararon con las secuencias de entrenamiento utilizadas en la sección 4.2.1.

Tabla 11: Resultados de Nucleotide Blast para muestras positivas de PCR. ND: no se pudo determinar

Código de muestra	Tipo de muestra	Origen de muestra	Procedencia	Resultado	Porcentaje de identidad
C3	Celular	Hámster	VBUY	<i>M. arginini</i>	99 %
C6	Celular	Humano	ORT	<i>M. hyorhinis</i>	99 %
V1	Viral	Bovino	VBUY	<i>M. arginini</i>	99 %
V4	Viral	Bovino	VBUY	<i>M. arginini</i>	99 %
V7	Viral	Bovino	VBUY	<i>M. arginini</i>	99 %
V8	Viral	Bovino	VBUY	<i>M. arginini</i>	99 %
V14	Viral	Canino	VBUY	-----	ND

Como se detalla en la Tabla 11, de las siete muestras que se enviaron a secuenciar:

- En las cuatro muestras provenientes de suspensiones virales de origen bovino (V1, V4, V7, V8) se pudo identificar la presencia de *M. arginini* como contaminante. Esta especie se encuentra normalmente en bovinos (6), por lo que se sospecha que la contaminación pudo provenir del aislamiento o ser introducida durante su cultivo en el laboratorio a través de suplementos tales como el SFB.
- Una muestra celular de origen de hámster (C3) presentó contaminación con *M. arginini*, lo que puede deberse, como se dijo anteriormente, a los sucesivos pasajes realizados con SFB como suplemento del medio del cultivo o por contaminación cruzada dentro del laboratorio, debido a la manipulación de otras líneas contaminadas con este *Mycoplasma* (22).
- Una muestra celular de origen humano (C6) presentó contaminación con *M. hyorhinis*. Esta especie se encuentra normalmente en suinos (6) por lo cual esta contaminación puede haberse introducido en la tripsina que se utiliza para desadherir la monocapa celular para realizar los subcultivos. No se cuenta con información extra sobre qué otras líneas celulares se manejan en el Laboratorio de Biotecnología de Universidad ORT, por lo que esta contaminación podría ser por el origen de otras líneas celulares.
- Una muestra viral de origen canino no presentó homología con ninguna de las secuencias reportadas en la base de datos. Analizando en mayor detalle dicha secuencia, se pudo observar que la misma presenta una extensión de 1000 pb frente a las 500 pb que se obtienen normalmente y se observan doble picos en el cromatograma de secuenciación. Si bien la presencia de doble picos podría dar indicios de estar frente a una muestra con dos contaminantes diferentes de *Mycoplasma*, la mayor longitud de la secuencia hace pensar que la muestra se pudo haber contaminado con el control interno de la PCR. Para confirmar esto, se deberá volver a realizar la PCR.

Ambas especies identificadas a través de este análisis –*M. hyorhinis* y *M. arginini*– se encuentran dentro de las seis especies más comúnmente detectadas como contaminantes en cultivos celulares (18). No se encontró ninguna especie de origen humano en las contaminaciones, por más que sea una de las principales causa de contaminación. Este resultado muestra que, la implementación de buenas prácticas para el manejo de cultivos celulares. Como ser la correcta vestimenta de los operarios brinda buenos resultados en cuanto a la prevención de contaminaciones por micoplasma provenientes de la manipulación.

Dentro del laboratorio de VBUY, todas las muestras analizadas presentaron la misma contaminación. Esto puede dar como indicio de que la introducción inicial de una línea celular o cepa viral contaminada fue la causante de la diseminación por el resto de los cultivos (22). Para confirmar este resultado, se debería realizar la secuenciación, del resto de las muestras que presentaron resultados positivos.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede confirmar nuevamente la importancia de:

- Utilizar materias primas de origen animal tales como sueros y tripsina, con certificado de análisis del fabricante de libre de micoplasma. En caso de no especificarlo, se deberán realizar las pruebas correspondientes para confirmarlo antes de poder aprobarlas para su uso en el laboratorio. En cuanto a este aspecto, en esta tesis se pudo poner a punto un procedimiento para poder analizar por PCR dicho tipo de muestras.

- Poner en cuarentena y realizar controles de detección de micoplasmas a las líneas celulares o cepas virales nuevas, de forma que se pueda evitar la introducción de una contaminación capaz de propagarse a otros cultivos. Sobre este otro aspecto, en este trabajo se puso a punto un procedimiento para poder analizar por PCR dicho tipo de muestras.
- Realizar controles de rutina para detectar micoplasma en los cultivos con los que se trabaja habitualmente, con el fin de poder prevenir contaminaciones por mal manejo de los mismos. De las muestras analizadas en este trabajo, no se estuvo en frente a un caso de esta categoría.
- Realizar la limpieza de las cámaras de flujo laminar y superficies del laboratorio de cultivo con productos que efectivamente controlen la contaminación por micoplasmas (sobre esto se discutirá en la sección 4.5).

4.3. Descontaminación de micoplasma de sobrenadante viral

4.3.1. Puesta a punto de un protocolo de descontaminación

Por cuestiones de confidencialidad se eliminaron partes de esta sección

Uno de los objetivos cruciales de esta tesis fue poner a punto un protocolo para la descontaminación de micoplasma de sobrenadantes virales. Si bien frente a una contaminación por micoplasma, lo recomendable es la eliminación del cultivo, muchas veces se tienen cepas que por su interés o por su origen resultan irremplazables (ej. aislamientos no comerciales), y por lo tanto se hace difícil la decisión de eliminarlas pero a su vez es imposible su uso para el desarrollo de productos industriales. Por otro lado, existen casos de cepas comerciales que están contaminadas con micoplasma o que provienen de pasos posteriores de descontaminación; tal es el caso de ATCC, que ahora informa en su página sobre cepas que son positivas para el test de micoplasma.

Si bien para la eliminación de la contaminación de cultivos celulares existe una vasta bibliografía (8, 9, 16), e incluso servicios tercerizados de descontaminación (Clean cells), para la descontaminación de cepas virales existe muy poca información disponible (23, 26). Por lo tanto nos pareció importante trabajar en el desarrollo y puesta a punto de una metodología para descontaminar sobrenadantes virales, para así poder recuperar cepas pertenecientes a la colección de VBUY que resulten interesantes para incluir en nuevos productos.

Para la puesta a punto, se trabajó con una muestra de sobrenadante viral de rotavirus bovino (RVB-1), siendo esta la misma muestra que se utilizó como control positivo en la PCR (sección 4.1) y el cultivo microbiológico (sección 4.2), a la que se le había asignado el código V1.

Una de las líneas celulares susceptibles a la infección por rotavirus es la MA104. Como contábamos con ellas en la colección de líneas celulares de VBUY se eligieron para propagar el RVB-1.

4.3.1.1. Evaluación de la toxicidad de antibiótico en MA104

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó el contenido de esta sección.

4.3.1.2. Puesta a punto de la descontaminación de micoplasma de sobrenadante viral

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó el contenido de esta sección.

4.3.2. Repetición del protocolo de desinfección puesto a punto

Por cuestiones de confidencialidad el contenido de esta sección fue eliminado.

4.3.3. Generación de un MVB y un WVB para RVB-2

Para poder almacenar y utilizar de manera adecuada la nueva cepa descontaminada en futuros ensayos de desarrollo, se procedió a la realización de un banco maestro (MVB) y a partir de éste un banco de trabajo (WVB). Para no partir de un cultivo con antibiótico, se utilizó el primer pasaje libre de antibiótico (RVB-2 – PV1.1) como punto de partida para infectar una botella T-75 cm². Esto permitió la generación de 20 crioviales de 2 mL cada uno para el MVB que fueron almacenados en nitrógeno líquido (-180°C). A partir de un criovial de MVB, se procedió al escalado de igual manera que lo detallado en la sección 3.8.2 para la creación del WVB. Se obtuvo un total de cinco frascos de 200 mL que fueron almacenados a -20 °C y luego a -80 °C, como se indicó en la sección 3.8.3. Ambos bancos fueron controlados en cuanto a la esterilidad, título viral y contaminación por micoplasma. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, obteniéndose un título viral de 10⁹, el cual es un título adecuado para las futuras aplicaciones del banco.

4.4. Estudio de contaminación en bioterio

Las infecciones por *Mycoplasma* pueden generar serios problemas en las colonias de roedores de los bioterios. Se han aislado numerosas especies presentes en roedores, pero la más común y la que genera síntomas en la mayoría de los casos es *M. pulmonis*. Los sitios típicos donde se encuentra colonizando son los oídos, pulmones y el tracto respiratorio superior (nasofaríngeo). Además de los síntomas respiratorios y otras complicaciones típicas, que muchas veces pueden pasar desapercibidas, la infección por *Mycoplasma* puede mediar la respuesta inmune. Por estos motivos, la infección por *Mycoplasma* puede comprometer la validez científica de los experimentos realizados con animales infectados. La vigilancia de las colonias de roedores se realiza principalmente por serología (ELISA o IF). Sin embargo, los animales pueden estar infectados, incluso por meses, sin el desarrollo de anticuerpos; por lo que la inclusión de otras técnicas alternativas como el cultivo microbiológico o la PCR suele ser de utilidad (28).

Los ratones cepa CD-1 utilizados por VBUY provienen de la DILAVE-MGAP. Estos animales son entregados con un certificado SPF, donde uno de los controles hace referencia específicamente a que se encuentran libres de *Mycoplasma* (ensayo serológico). Una vez dentro del bioterio, los animales son alojados y criados como animales convencionales; donde no existen barreras suficientes para asegurar que los mismos continúan de calidad SPF.

Por este motivo, nos pareció interesante y muy importante probar si la PCR puesta a punto en esta tesis puede aplicarse como control interno para monitorear el estado sanitario respecto a *Mycoplasma* de la colonia alojada dentro de VBUY.

Como paso previo al estudio de la contaminación en animales de bioterios, se realizó un análisis bioinformático para comprobar que los *primers* utilizados en la reacción de PCR amplificaban correctamente *M. pulmonis*; la literatura muestra a los *primers Forward* como

capaces de reconocer varias especies dentro del género *Mycoplasma*, pero no así los Reverse (16).

Este análisis se realizó descargando la secuencia completa del rADN 16S de *M. pulmonis*, y luego se utilizó la herramienta PrimerBlast para ver si los *primers* lograban amplificar el fragmento a partir de la secuencia de esta especie de *Mycoplasma* (Figura 20).

>[AL445565.1](#) Mycoplasma pulmonis (strain UAB CTIP) complete genome; segment 3/3

```
product length = 517
Forward primer 1      CACCTGAGTAGTATGCTCGC 20
Template        165440 ..... 165421

Reverse primer 1      GCGGTGTGTACAAGACCCGA 20
Template        164924 ..... 164943
```

Figura 20: Resultados de PrimerBlast para el gen del rRNA 16S de *M. pulmonis*. De existir diferencias entre las secuencias de los *primers* y la secuencia de *M. pulmonis* (*Template*), los *missmatches* se señalarán dentro de *Template*. Los *primers* se muestran como 5'-3' para el *primer Forward* (3.2 Tabla 8) y 3'-5' para el *Reverse* (*Primer Reverse 2* Tabla 8). Puede apreciarse que no hay *missmatches* y que por lo tanto se puede esperar que este par amplifique la secuencia para *M. pulmonis*.

Ambos *primers* presentan 100 % de identidad con la secuencia del gen del rARN16S de *M. pulmonis* (Figura 20). Este resultado era esperable para el *primer Forward*, ya que la bibliografía lo marcaba como un *primer* que fue diseñado específicamente para poder detectar esta especie pero no se conocía con anticipación que iba a suceder con el *primer Reverse* (16). El producto de esta PCR generaría un fragmento de 517 pb que se corresponde con lo esperado para otras especies.

A continuación, se procedió a realizar un lavado pulmonar de los diferentes ratones seleccionados (Figura 23). Se procesó un total de nueve ratones machos y hembras, siete de los cuales se encontraban alojados hacia un mes dentro de las instalaciones del bioterio de VBUY (identificados como R3-R9) y dos ratones control que no tuvieron contacto previo con los animales alojados en VBUY (identificados como R1 y R2).

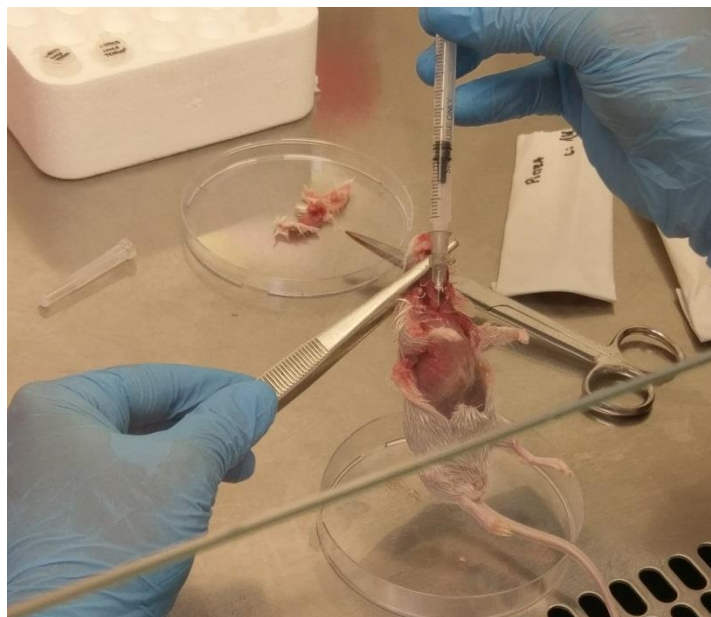


Figura 23: Inyección de suero fisiológico en la cavidad pulmonar de un ratón para la realización del lavado pulmonar (imagen tomada en el transcurso de esta tesis).

Como se observa en la Figura 24, en todos los resultados de los lavados pulmonares se logró amplificar el control interno y no se encontró ningún caso en el cual se amplificara la banda de 500 pb correspondiente a un resultado positivo. La amplificación del control interno muestra que el protocolo puesto a punto para el tratamiento de muestras provenientes de cultivo celular, también pudo aplicarse para muestras de lavado pulmonar de ratones ya que no se evidenció en ningún caso inhibición de la PCR.

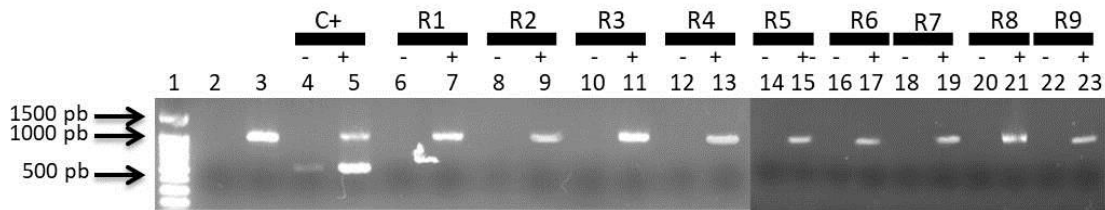


Figura 24: Resultados de PCR de lavados pulmonares realizados a ratones de laboratorio. Carril 1: PM ladder de 100pb, 2: blanco de reacción (agua), 3: Control Interno (CI), 4: control positivo (C+: ADN de extracción viral- V1), 5: V1+ CI. Los carriles marcados con “+” indican que las muestras poseen CI. R1 y R2: ratones control (no alojados en VBUY), R2 a R9: ratones alojados durante un mes en el bioherio de VBUY.

Si bien estos resultados negativos podrían llevar a concluir que los ratones analizados no presentan *M. pulmonis*; es necesaria la inclusión de algunos controles adicionales para poder afirmarlo con certeza.

- Un control positivo, que consista en el ADN genómico de la cepa de *M. pulmonis*, que podría ser obtenida a partir de un aislamiento animal o comprada como cepa de referencia. De esta forma se podría confirmar empíricamente, y no solo bioinformáticamente o a través de resultados de la literatura, que estos *primers* bajo las condiciones empleadas en este trabajo son capaces de amplificar el fragmento del gen rARN 16S de *M. pulmonis* (2, 16).
- Un control positivo del lavado pulmonar. Si bien el procedimiento fue realizado siguiendo diferentes protocolos reportados en la literatura (26), habría que confirmar que este procedimiento, en el caso de existir *Mycoplasma* colonizando los pulmones, es capaz de extraerlos de estos órganos y detectarlos mediante la PCR. Para ello habría que desarrollar un modelo de infección por *Mycoplasma* en ratones y proceder luego con el lavado. Dado el potencial riesgo que implica la introducción de una cepa de *Mycoplasma* al área de cultivo microbiológico, la complejidad del desarrollo de un modelo de infección en ratones, y el peligro que implica la introducción de animales infectados a un área de alojamiento, se decidió no incursionar en la generación de estos controles. De todas formas, se está buscando algún laboratorio de investigación que pueda proveernos al menos una muestra de ADN genómico de *M. pulmonis*.

4.5. Contaminación ambiental

Por cuestiones de confidencialidad se eliminó todo el contenido de esta sección.

5. ANÁLISIS ECONÓMICO

A lo largo de este trabajo fue posible desarrollar cuatro metodologías que, además de permitir la independencia de la empresa frente a servicios externos, pueden generar un alto impacto económico para VBUY.

1. Puesta a punto de un método de detección para micoplasma dentro de VBUY

El costo de una reacción de PCR dentro de VBUY está evaluado en un valor aproximado de U\$S 1 por reacción, mientras que la tercerización de este servicio llega a U\$S 22 por reacción (IPMont). La implementación del método de manera interna permite independizarse de servicios externos y poder contar con los resultados en un menor tiempo.

2. Desarrollo de un método de eliminación de contaminación por micoplasma en cepas virales dentro de VBUY

En cuanto al protocolo de desinfección, en la Tabla 17 se muestra un estimativo del costo del mismo al ser realizado dentro de las instalaciones de la empresa para una cepa viral.

Tabla 17: Estimativo de costos para la desinfección de una cepa viral y con un operador con un cargo de Analista.

Insumo	Unidad	Precio por unidad (U\$S)	Unidades utilizadas	Costo (U\$S)
Botellas T-25	1 botella	1	32	32
Pipetas 10 mL	1 pipeta	0.3	40	12
Tips 200 µL con filtro	1 caja de 96 tips	7	1	7
Tips 20 µL con filtro	1 caja de 96 tips	7	1	7
Placa de 96 pocillos	1 placa	1	8	8
Antibiótico	10 uL	1	20	20
PCR	1 reacción	1	8	8
Sueldo	1 hora	10	80	800
Total				894

Si bien para la eliminación de micoplasma de cultivos celulares existen numerosos laboratorios que brindan el servicio, para la desinfección de cepas virales no es tan extendido. Se encontró una empresa en Francia, Clean Cells, que puede brindar este servicio, siempre y cuando se le entregue el suero, el medio de cultivo y la tripsina a utilizar, razón por la cual estos no fueron cotizados en el estimativo de costos. Clean Cells propone desinfectar una cepa de viral por el costo de U\$S 8.300. A este precio hay que agregar la inversión que VBUY debe hacer en recursos humanos para el seguimiento de todo el proceso. Por otro lado, también tiene la desventaja de que se le deben proporcionar las células susceptibles al virus y los protocolos de cultivo celular y de infección viral (*know-how*). En la Tabla 18, se puede observar que el proceso de desinfección puesto a punto en esta tesis es casi diez veces más económico que el de Clean Cells.

Tabla 18: comparación de costos para la desinfección de una cepa viral de micoplasma

	Interno	CleanCells
U\$S	894	8.300

3. Monitoreo ambiental de micoplasma dentro de VBUY

Se logró demostrar que el procedimiento de desinfección que se utiliza en las áreas industriales es efectivo contra micoplasma (acción correctiva). Esto, unido al hecho de que se pudo poner a punto el cultivo microbiológico como forma de control y monitoreo ambiental (acción preventiva), implica un resultado de gran valor para la empresa.

4. Monitoreo de la colonia de ratones del bioterio de VBUY

Por otra parte se estuvo trabajando en la puesta a punto de una PCR para la detección de contaminaciones en líquidos pulmonares de ratones. Esto permitiría tener un estricto control sobre los mismos, el cual es de suma importancia ya que, una contaminación de los animales utilizados en el bioterio puede causar resultados erróneos. Debido a que los animales son utilizados para el control de los productos biológicos, la presencia de *Mycoplasma* en la colonia de ratones puede traer consecuencias graves e indeseadas.

6. CONCLUSIONES

Se logró poner a punto dentro de VBUY un ensayo de PCR para la detección de micoplasma basado en el descrito por Uphoff (17). Para este ensayo se puso a punto el tipo de procesamiento que requieren las muestras según su origen para la extracción de ADN. Se redactó un POE para uso interno a la empresa, con su registro, para la detección de micoplasma por PCR y el correspondiente tratamiento de muestras.

Se puso a punto el cultivo microbiológico para micoplasma basado en lo descrito en el 9 CFR §113.28. Para este ensayo se redactó un POE con su correspondiente registro para uso interno de la empresa. Este protocolo tiene valor agregado de poder ser usado como parte de controles ambientales de rutina para micoplasma (acción preventiva).

Se realizó una aproximación a la validación de la PCR. Los ensayos muestran un LOD que es menor a 0.4 pg de ADN. Se analizaron 16 muestras (la mayoría cultivos virales) que mostraron resultados concordantes con los hallados por el servicio de la Unidad de Biología Celular del IPMont. Se procesaron un total de 13 muestras por PCR y cultivo microbiológico; los resultados obtenidos por PCR mostraron un porcentaje de acierto de 93 % respecto al cultivo (coeficiente ϕ de Pearson= 0.84), y un valor predictivo positivo y negativo de 100 % y 89 %, respectivamente.

Mediante la secuenciación del producto de PCR de muestras positivas y un posterior análisis bioinformático, se logró identificar las especies de *Mycoplasma* contaminantes. Éstas fueron *M. arginini* (bovina) y *M. hyorhina* (suina), ambas reportadas en la literatura como contaminantes frecuentes en laboratorios de cultivo celular. El no haber encontrado cepas de origen humano marca la importancia de la implementación de buenas prácticas al momento de trabajar.

Se realizaron PCRs para el monitoreo de colonias de ratones del bioterio de VBUY las cuales otorgaron resultados negativo. Sin embargo la falta de inclusión de controles internos, no permite afirmar con total seguridad que los resultados obtenidos demuestran la ausencia de *Mycoplasma* en los animales.

Se desarrolló y se puso a punto un protocolo de descontaminación de micoplasma para cultivos virales que mostró resultados satisfactorios para al menos dos cepas de RVB. Para este ensayo se redactó un POE para uso interno de la empresa.

Finalmente, los protocolos de PCR y de descontaminación de cepas virales puestos a punto en este trabajo resultan económicamente rentables frente a los servicios ofrecidos por empresas tercerizadas. Esto genera por un lado un impacto económico positivo, además de la independencia de los servicios tercerizados. Estas herramientas tienen por otro lado, el valor agregado de poder usarse como acción preventiva para monitoreo de cepas (PCR) y acción correctiva frente a una eventual contaminación (desinfección).

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rottem, S., & Kahane, I. *Mycoplasma cell membranes*. Nueva York (Vol. 20): Springer Science & Business Media, 2012.
2. Pisal, R. V., Hrebíková, H., Chvátalová, J., Kunke, D., Filip, S., & Mokry, J. Detection of mycoplasma contamination directly from culture supernatant using polymerase chain reaction. *Folia Biologica*. 2016, 62(5), 203–206.
3. Wirth, M., Berthold, E., Grashoff, M., Pftitzner, H., Schubert, U., & Hauser, H. Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. *Cytotechnology*. 1994, 16, 67–77.
4. Young, L., Sung, J., Stacey, G., & Masters, J. R. Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature Protocols*. 2010, 5(5), 929–934.
5. Markoullis, K. Mycoplasma contamination of murine embryonic stem (mES) cells: sensitivity of detection, effects on cytogenetics, germ line transmission and chimeric progeny. Institute of veterinary pathology Munich, Germany. 2008
6. Windsor, H. Prevention and Control of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures. Trabajo presentado en: IRPCM. Proceedings of the IRPCM mollicute contamination in cell cultures and bioproducts team; Julio 2010.
7. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. Eradication of mycoplasma contaminations. *Methods in Molecular Biology*. 2004, 946(April), 15–26.
8. Nikfarjam, L., Parvaneh, F. Prevention and Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. *Cell Journal*. 2012, 13(4), 203–212.
9. Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 2002 39(2), 75–90.
10. Eterpi, M., McDonnell, G., & Thomas, V. Decontamination efficacy against Mycoplasma. *Letters in Applied Microbiology*. 2010, 52(2), 150–155.
11. Wodke, J. A., Puchałka, J., Lluch-Senar, M., Marcos, J., Yus, E., Godinho, M., Gutierrez-Gallego, R., Martins dos Santos, V. A. P., Serrano, L., Klipp, E., & Maier, T. Dissecting the energy metabolism in *Mycoplasma pneumoniae* through genome-scale metabolic modeling. *Molecular systems biology*. 2013, 9(1), 653.
12. Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998, 62(4), 1094-1156.
13. Stanier, R. Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M. L., Painter, P. R. Mollicutes. En *Reverté. Microbiología*. 2da ed: Reverté. Barcelona, 1996, p 557-561.
14. Nübling, C. M., Baylis, S. A., Hanschmann, K.-M., Montag-Lessing, T., Chudy, M., Kreß, J., Ulrych, U., Czurda, S., Rosengarten, R. World Health Organization International Standard To Harmonize Assays for Detection of Mycoplasma DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, 81(17), 5694–5702.
15. Brown, T. *Genomas*. Buenos Aires: Médica Panamericana. 2008.

16. Uphoff, C. C., Denkmann, S. A., & Drexler, H. G. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with plasmocin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012, 2012(1).
17. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Animal. 2001, 38(2), 79–85.
18. Uphoff, C., & Drexler, H. Detection of mycoplasma in leukemia–lymphoma cell lines using polymerase chain reaction. *Leukemia*. 2002, 16, 289–293.
19. Cobo, F., Cortés, J. L., Cabrera, C., Nieto, A., & Concha, Á. Microbiological contamination in stem cell cultures. *Cell Biology International*. 2007, 31(9), 991–995.
20. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Cancer Cell Culture*. 2011, 731(1), 93–103.
21. Sakhaei, D., Pournakhsh, S. A., Banani, M., Lotfi, M., Akhlaghi, F., & Asli, E. Using PCR and culture methods for Mycoplasma testing in poliomyelitis vaccine. *Archive of Razi Insitute*. 2009, 64(2), 109-114.
22. McGarrity, G. J. Spread and control of mycoplasmal infection of cell cultures. *In vitro*. 1976, 12(9), 643-648.
23. Baronti, C., Pastorino, B., Charrel, R., & de Lamballerie, X. Mycoplasma removal: Simple curative methods for viral supernatants. *Journal of Virological Methods*. 2012, 187(2), 234–237.
24. *Journal of Cell Biology, Submission Guidelines* [Internet]. JCB by Rockefeller University Press; Enero 2018 [citado: 2018 Feb 18]. Disponible desde: <http://jcb.rupress.org/submission-guidelines>.
25. Eldering, J. A., Felten, C., Veilleux, C. A., & Potts, B. J. Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals*. 2004, 32(4), 183–193.
26. Malenovska, H., & Reichelova, M. Elimination of mycoplasma contamination of virus stocks. *Veterinarni Medicina*. 2011, 56(11), 547–550.
27. Ferreira, J. B., Yamaguti, M., Marques, L. M., Oliveira, R. C., Neto, R. L., Buzinhani, M., Timenetsky, J. Detection of Mycoplasma pulmonis in laboratory rats and technicians. *Zoonoses and Public Health*. 2008, 55, 229-234.
28. Charles River Research Models and Services. Technical sheet: Mycoplasma pulmonis. Charles River Research Models and Services. 2009.
29. Ingebritson, A. L., Gibbs, C. P., Tong, C., & Srinivas, G. B. A PCR detection method for testing mycoplasma contamination of veterinary vaccines and biological products. *Letters in Applied Microbiology*. 2015, 60(2), 174–180.
30. The Code of Federal Regulations, 9 CFR §113.28.
31. European Pharmacopoeia Commission, & European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (2010). *European pharmacopoeia* (Vol. 1). Council of Europe. 159-164.

32. U.S. Pharmacopoeia (2007). Chapter 63: Mycoplasma test. Md: United States Pharmacopoeial Convention, Inc.
33. Finnegan, M., Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C., & Maillard, J. Y. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010, 65(10), 2108-2115.
34. Linley, E., Denyer, S. P., McDonnell, G., Simons, C., & Maillard, J. Y. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*. 2012, 67(7), 1589-1596.
35. Otter, J. A., Chewins, J., Windsor, D., & Windsor, H. Microbiological contamination in cell culture: A potential role for hydrogen peroxide vapour (HPV)? *Cell Biology International*. 2008, 32(2), 326–327.
36. Hopert, A., Uphoff, C. C., Wirth, M., Hauser, H., & Drexler, H. G. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in cell lines. *Journal of Immunological Methods*. 1993, 164(1), 91–100.
37. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012, 13, 134.
38. Sambrook J., Rusell D. W. Electrophoresis Buffers. En: CSHL Press. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3era. ed. Nueva York: CSHL Press; 2001. Tomo 1, capítulo 5.8,
39. Sambrook J., Rusell D. W. Gel-Loading Buffers. En: CSHL Press. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 3era. ed. Nueva York: CSHL Press; 2001. Tomo 1, capítulo 5.8,
40. ATCC, MA104 Product Information [Internet], ATCC Build 1.1.54.0 [citado: 2018 Feb 25]. Disponible desde: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2378.1.aspx#generalinformation>.
41. ATCC, RVB Product Information [Internet]. ATCC Build 1.1.54.0 [citado: 2018 Feb 25]. Disponible desde: <https://www.atcc.org/products/all/VR-1290.aspx#specifications>.
42. Ojeh, C. K. Isolation and propagation of bovine rotavirus in cell culture. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*. 1984, 37(4), 400-405.
43. Data Sheet Plasmocin™ Treatment [Internet]. Invivogen: Version 18C26-MM [citado: 2018 Feb 25]. Disponible desde: http://www.invivogen.com/PDF/Plasmocin_TDS.pdf
44. GoodView™ Nuclei Acid Stain Ecoli s.r.o. [Internet]. Studenohorská 12, 841 03 Bratislava 47, Slovenská republika, [citado: 2018 Feb 25]. Disponible desde: http://www.ecoli.sk/files/documents/goodview_instruction.pdf.
45. Ethidium Bromide (EtBr) Dye for DNA and RNA Detection ThermoFisher [Internet]. ThermoFisher Scientific, [citado: 2018 Feb 25]. Disponible desde: <https://www.thermoFisher.com/uy/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/etbr.html>.
46. Janetzko, K., Rink, G., Hecker, A., Bieback, K., Klüter, H., & Bugert, P. A single-tube real-time PCR assay for Mycoplasma detection as a routine quality control of cell therapeutics. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2014, 41(1), 83-89.

47. Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J. P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T. G., & Van Etten, J. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of bacteriology*. 1989, 171(12), 6455-6467.
48. AEMPS, Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea, Medicamentos de uso humano y uso veterinario, Anexo I, pág. 7 [Internet], Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, [citado: 2018 Feb 27]. Disponible desde: <https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/home.htm>.