

## Identificación de micoplasmas en cultivos celulares: comparación de dos técnicas

B.V. RODRÍGUEZ, E. ALMORA Y J.L. ALFONSO

Departamento de Cultivo de Tejido Animal, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave. 25 y 158, Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1989

Aprobado en febrero de 1989

### RESUMEN

La incidencia de la infección por micoplasmas en los cultivos celulares ha sido un problema serio en las investigaciones biológicas.

Se han desarrollado una variedad de técnicas inmunológicas para identificar tal infección, entre ellas, la inhibición del crecimiento, la inmunofluorescencia, y la inhibición metabólica son las más utilizadas. En el presente trabajo la inhibición del crecimiento fue comparada con la prueba de *Immunobinding* para identificar especies de micoplasmas infectando cultivos celulares. La infección fue confirmada previamente por los métodos convencionales.

### SUMMARY

The incidence of mycoplasma infection in cell cultures has been a serious problem in biological research. A variety of immunological techniques have been developed to identify such infection, among them, growth inhibition, immunofluorescence and metabolism inhibition are the most used.

In the present work the growth inhibition test was compared with the *immunobinding* test to identify species of mycoplasma infecting cell cultures. The infection was previously confirmed by conventional methods.

### INTRODUCCION

La infección de cultivo de células animales por micoplasmas se reporta desde hace tiempo, tratándose con profundidad en los últimos años a causa de los efectos y consecuencias que provocan en las investigaciones biológicas que dependen de células cultivadas (Schmidt y Erfle, 1984; Ruth *et al.*, 1985; McGarrity *et al.*, 1984).

En la identificación de estos organismos se han utilizado numerosas técnicas inmunológicas, tales como la inhibición del crecimiento, inhibición metabólica, inmunofluorescencia, epifluorescencia e inmunoperoxidasa, las cuales varían en especificidad y sensibilidad (Taylor, 1978).

Procedimientos tales como inmunofluorescencia y epifluorescencia son más sensibles que la inhibición del crecimiento e inhibición metabólica, pero requieren de un microscopio de fluorescencia que no es disponible en todos los laboratorios.

La epifluorescencia puede detectar mezclas de micoplasmas, pero requiere su utilización en cultivos frescos, ya que pueden ocurrir reacciones inespecíficas al utilizar cultivos viejos, por lo que la utilización de una técnica que en sensibilidad, rapidez y especificidad sea superior a las anteriores, y que a su vez no requiera de equipamiento especial tiene un valor potencial superior. Tal es el caso de la prueba de *Immunobinding* reportada en la identificación rápida de micoplasmas (Kotani y McGarrity, 1985; Kotani y McGarrity, 1986) y utilizada por nosotros en este trabajo en comparación con la técnica de inhibición del crecimiento, con el objetivo de identificar las especies de micoplasmas que infectan las líneas celulares FL (amnios humano), Vero (riñón de mono verde africano) y L41 (pulmón humano). La infección fue detectada previamente en estos cultivos por los métodos convencionales reportados para detectar micoplasmas en cultivos celulares (cultivo microbiológico y tinción nuclear con Hoechst 33258).

## MATERIALES Y METODOS

### Líneas celulares

Se estudiaron las líneas celulares FL (amnios humano), Vero (riñón de mono verde africano) y L41 (pulmón humano), mantenidas en MEM suplementado con aminoácidos no esenciales, y 10 % de suero de ternero, creciendo a una temperatura de incubación de 37°C en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> y en medio libre de antibióticos.

### Detección de la infección

Los cultivos celulares fueron sometidos previamente a los métodos convencionales de diagnóstico, para partir de un verdadero criterio acerca de la infección en los mismos, desarrollando el método de cultivo microbiológico (Stanbridge y Schneider, 1977) y la tinción nuclear con el fluorocromo Hoechst 33258 con sus correspondientes controles positivo y negativo (Chen, 1977; McGarrity *et al.*, 1983) de la misma forma en que se reporta en la literatura.

### Ensayo de *Immunobinding*

Con este fin se realizó el procedimiento descrito por Kotani y McGarrity, 1985. El ensayo se realizó en placas de nitrocelulosa (0,45), en las cuales fueron transferidas 10 µl de las muestras provenientes de los cultivos celulares anteriormente mencionados, y además, caldo de cultivo correspondiente a las cepas de *Mycoplasma arginini* y *Mycoplasma hyorhinis* y medio de cultivo PPLO, utilizados como controles. Se realizaron de igual forma 2 placas a las cuales se les añadió formalina al 10 % tamponada con fosfatos durante 10 minutos, para continuar con un lavado con TBS (50 mM Tris y 200 mM NaCl; pH 7,4), 5 minutos. Posteriormente se añadió H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3 % en TBS 10 minutos, lavándose nuevamente las placas con TBS durante 5 minutos, para adicionarles una solución de bloqueo (10 % suero de caballo; 0,02 % Tween 20 y TBS) durante 30 minutos.

En una de las placas se añadió antisuero anti-*M. arginini* y en la otra antisuero anti-*M. hyorhinis*, ambos producidos en conejo, y utilizándose a una dilución de 1:1000, a temperatura ambiente durante 30 minutos; seguidamente se realizaron tres lavados con TBS, 3 minutos, para posteriormente aplicar el conjugado de peroxidasa anti-IgG de conejo en carnero durante 30 minutos, al cabo de los cuales las placas fueron lavadas tres veces con TBS, durante 3 minutos y sometidas a una solución de desarrollo de 4 cloro-1 naftol, a partir de la cual pudimos identificar la especie de micoplasma específica por la aparición de color púrpura en la reacción final.

### Inhibición del crecimiento

Esta prueba de identificación se realizó según lo reportado por Clyde en 1964, realizando un cultivo en caldo PPLO de cada una de las líneas celulares, durante 18 horas, a partir de los cuales se hicieron diluciones en el mismo medio de cultivo de 1:10 y 1:100. Se utilizó una placa de agar PPLO para cada línea, dejando correr una gota (10 µl) de cada dilución en línea recta cortando el agar con un asa al final para que la gota no continuara.

En el centro de la línea se colocaron los discos previamente impregnados con 20 $\mu$ l del antisuero correspondiente para cada caso (cada una de las muestras a identificar fueron sometidas en el ensayo a los antisueros específicos a *M. arginini* y *M. hyorhinis* suministrados por el doctor G.J. McGarrity del Corriell Institute for Medical Research), en cada placa se utilizó como control un disco impregnado con suero de conejo normal y finalmente las mismas fueron incubadas en anaerobiosis con 5 % de CO<sub>2</sub>, hasta que las colonias fueran visibles (1-5 días). Se realizaron además placas controles en las que aplicamos diluciones de los cultivos de *M. arginini* y *M. hyorhinis*, cada uno ante los antisueros anteriormente mencionados.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Fue comprobado por el método de cultivo microbiológico y tinción nuclear con Hoechst 33258 la infección con micoplasma en las líneas celulares FL, Vero y L41, mediante lo obtenido como resultado de cada método de detección aplicado (Rodríguez *et al.*, 1987).

Los resultados obtenidos en el ensayo de *immunobinding* correspondientes para cada antisuero utilizado se observan en las figuras 1 y 2.

Al utilizar antisuero anti-*M. arginini* obtuvimos reacción positiva en el caso de FL, y por supuesto, en la aplicación del cultivo de *M. arginini* utilizado como control positivo, siendo negativo para este caso las líneas celulares Vero y L41 y funcionando bien el control negativo utilizado (cultivo de *M. hyorhinis*) así como la muestra de caldo de cultivo (fig. 1).



FIG. 1. Ensayo de *Immunobinding* en cultivos celulares, utilizando un antisuero anti-*M. arginini*: 1) caldo *M. arginini*; 2) caldo *M. hyorhinis*; 3) línea celular FL; 4) línea celular L41; 5) línea celular Vero y 6) medio de cultivo PPLO.

En la utilización del antisuero anti-*M. hyorhinis* obtuvimos como muestra positiva la línea celular Vero, en correspondencia con el control positivo utilizado para este caso (cultivo de *M. hyorhinis*), dando como resultado negativo las líneas celulares FL y L41, así como el control negativo (cultivo de *M. arginini*) y la muestra correspondiente a medio de cultivo (fig. 2). Debemos destacar que en el caso de la línea celular L41 a pesar de presentar infección por micoplasma lo cual fue detectado por los métodos utilizados, fue imposible identificar la especie en cuestión al utilizar estos antisueros lo cual evidencia que la incidencia de infección en este cultivo celular es por una especie diferente a *M. arginini* y *M. hyorhinis*.

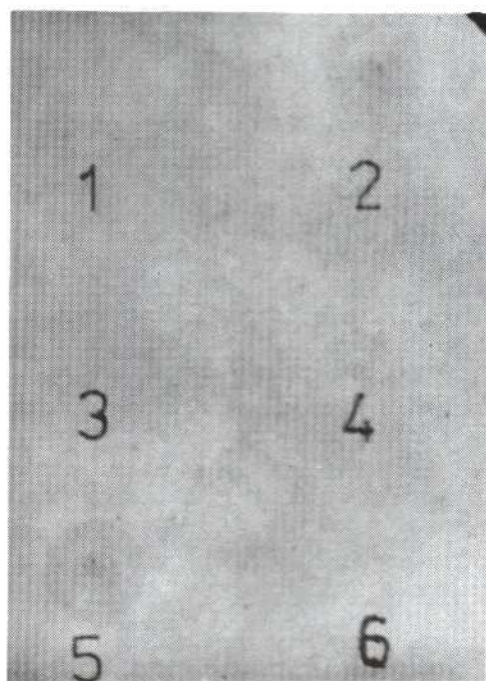


FIG. 2. Ensayo de *Immunobinding* en cultivos celulares utilizando un antisuero anti-*M. hyorhinis*: 1) caldo *M. arginini*; 2) caldo *M. hyorhinis*; 3) línea celular FL; 4) línea celular L41; 5) línea celular Vero y 6) medio de cultivo PPLO.

Los resultados obtenidos al utilizar la prueba de inhibición del crecimiento por antisueros específicos se observan en la tabla 1 y fueron similares a lo obtenido por la prueba de *immunobinding* desde el punto de vista de identificación.

Tabla 1  
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO  
EN LA IDENTIFICACION DE MICOPLASMAS EN CULTIVOS CELULARES

	<i>M. arginini</i>	<i>M. hyorhinis</i>	FL	Vero	L41
Antisuero anti- <i>M. arginini</i>	+	-	+	-	-
Antisuero anti- <i>M. hyorhinis</i>	-	+	-	+	-

En la placa correspondiente a la línea celular FL observamos para cada dilución una zona de inhibición alrededor del disco impregnado con antisuero anti-*M. arginini*, ocurriendo lo contrario en el caso de la placa en que se utilizaron discos impregnados con antisuero anti-*M. hyorhinitis*. De la misma forma observamos inhibición del crecimiento en el caso de la muestra correspondiente a la línea celular Vero frente al disco impregnado con antisuero anti-*M. hyorhinitis*, no ocurriendo así frente al disco correspondiente a *M. arginini* donde se observa crecimiento total incluso en los bordes del disco.

Este crecimiento en todos los casos se manifiesta por la observación de colonias típicas con apariencia de huevo frito características de los micoplasmas, las cuales mantienen esta constitución en zonas alejadas del disco y cerca de éste van perdiendo en tamaño, mostrándose algunas veces hasta deformes, en los casos en que el antisuero utilizado sea específico a la especie de micoplasma identificada.

En el caso de las placas correspondientes a los controles utilizados (cultivo de *M. arginini* y *M. hyorhinitis*), los resultados fueron los esperados frente a cada uno de los antisueros específicos.

Mediante la utilización de la prueba de inhibición del crecimiento por antisueros específicos fue imposible identificar la especie de micoplasma que infecta el cultivo celular correspondiente a L41, lo cual corrobora lo obtenido por el ensayo de *immunobinding* para este caso. Los resultados obtenidos por cada prueba por separado fueron iguales, sin embargo es evidente las ventajas que ofrece uno con respecto a otro.

El *immunobinding* es un método altamente eficiente y sensible para identificar micoplasmas, incluso en el orden de los  $10^4$  UFC/ml (Kotani *et al.*, 1987), el procedimiento es extremadamente rápido (2-3 horas), comparado con la técnica de inhibición del crecimiento la cual requiere de períodos de incubación prolongados y manipulación bajo condiciones de esterilidad pudiéndose afectar en algún momento el resultado final, además de que esta última técnica requiere de que el cultivo celular a ensayar tenga una concentración de micoplasma de alrededor de  $10^7 - 10^8$  UFC/ml en el mismo para poder dar positiva en el resultado final.

El *immunobinding* es superior también a otras técnicas pues es capaz de identificar una especie de micoplasma en cultivos mezclados, incluso se ha reportado su utilización en la identificación de colonias de este microorganismo provenientes de las placas de agar (Kotani y McGarrity, 1986), no sólo en cultivos frescos sino en cultivos sometidos a un mayor número de pases, utilizando diluciones del antisuero del orden 1:1 000 a 1:30 000 lo cual la hace superior a la técnica de epifluorescencia, que sólo puede aplicarse a cultivos frescos para evitar la ocurrencia de reacciones cruzadas y además requiere la utilización del antisuero mucho más concentrado.

En nuestro caso, la aplicación de este método nos permitió conocer exactamente la especie de micoplasma que infecta dos cultivos celulares presentes en nuestro departamento, en un tiempo menor a lo obtenido por los métodos convencionales.

## REFERENCIAS

- CHEN, T.R. (1977). In situ detection of mycoplasma contamination of cell cultures by fluorescent Hoeschst 33258 stain. *Exp. Cell. Res.* 104: 255-262.
- CLYDE, W.A. (1964). *Mycoplasma species identification based on growth inhibition by specific antisera.* *J. Immunol.* 94: 958-965.
- KOTANI, H. y G.J. MCGARRITY (1985). *Rapid and simple identification of mycoplasma by immunobinding.* *J. Immunol. Methods*, 85: 1-11.

- KOTANI, H. y G.J. McGARRITY (1986). *Identification of mycoplasma colonies by immunobinding*. J. Clin. Microbiol. 23: 783-785.
- KOTANI, H.; H. HUANG y G.J. McGARRITY (1987). *Identification and isolation of mycoplasmas by immunobinding*. Israel Journal of Medical Sciences 23: 752-758.
- McGARRITY, G.J.; T. STEINER y L. GAMON (1984). "Prevention, detection and control of mycoplasma infection of cell culture", en: *Handbook of mutagenicity test procedures*. 2da. edición (Eds. B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols y C. Ramed), pp. 823-839. Elsevier, Amsterdam.
- McGARRITY, G.J.; T. STEINER y V. VANAMAN (1983). "Detection of mycoplasmal infection of cell cultures by DNA fluorochrome staining", en: *Methods in Mycoplasmaology*. Vol. II. (Eds. S. Razin y J.G. Tully) pp. 68-79. Academic Press, New York.
- RODRIGUEZ, B.V.; A.J. OTERO; J.L. ALFONSO y A. RODRIGUEZ (1987). *Micoplasmas y cultivos celulares*. Interferón y Biotecnología 4: 95-107.
- RUTH, E.; M. RANDY; E. FRIEDRICH y H. PERSSON (1985). *Mycoplasma mimicry of lymphokine activity in T cell lines*, Scand. J. Immunol. 21: 593.
- SCHMIDT, J. y V. ERFLE (1984). *Elimination of mycoplasma from cell cultures and establishment of mycoplasma free cell lines*. Exp. Cell, Res. 152: 565-570.
- STANBRIDGE, E.J. y E.L. SCHNEIDER (1977). *The need for non cultural methods for the detection of mycoplasma contaminants*. Develop. Biol. Standard 37: 191-200.
- TAYLOR-ROBINSON, D. (1978). "Cultural and serological procedures for mycoplasma in tissue culture", en: *Mycoplasma infection of cell cultures*. G.J. McGarrity; D.G. Murphy and W.W. Nichols. (Eds.) Plenum Press. New York, pp. 47-56.