



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IMPLEMENTACIÓN DE RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE
Mycoplasma CONTAMINANTE EN CULTIVOS CELULARES
POR LA UNIDAD DE SERVICIOS CLÍNICOS Y
DIAGNÓSTICO MOLECULAR FQ-UAQ”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOAQUÍN ROJAS LEAÑOS

DIRIGIDA POR

M. en IM. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Implementación de RT-PCR para la detección de
Mycoplasma contaminante en cultivos celulares por la
Unidad de Servicios Clínicos y Diagnóstico Molecular
FQ-UAQ

por

Joaquín Rojas Leños

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](#).

Clave RI: FQLIN-235953



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“IMPLEMENTACIÓN DE RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE
Mycoplasma CONTAMINANTE EN CULTIVOS CELULARES
POR LA UNIDAD DE SERVICIOS CLÍNICOS Y
DIAGNÓSTICO MOLECULAR FQ-UAQ”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

PRESENTA

JOAQUÍN ROJAS LEAÑOS

DIRIGIDA POR

M. en IM. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ

SINODALES

M. en IM. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ

DIRECTOR

M. en C. BRENDA UGALDE VILLANUEVA

SINODAL

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE

SINODAL

QFB. SABINA SÁNCHEZ VÉLEZ

SINODAL

A mi familia, por ser el motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por, prepararme y abrirme las puertas al mundo profesional.

A mis padres; Ana y Joaquín, y a mi hermano Mauricio, por su amor, su apoyo incondicional y por creer en mí desde que tengo memoria. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como estudiante y como persona.

A mi novia Ivanna, por estar conmigo durante este proceso brindándome su apoyo desde el primer día de este trabajo.

Al MIM. David Gustavo García Gutiérrez y a la Unidad de Servicios Clínicos y Diagnóstico Molecular, por impulsarme a hacer este trabajo y proporcionarme el espacio para realizarlo.

A la M. en C. Alma Delia y M. en C. Brenda por sus revisiones y correcciones en esta tesis.

Un agradecimiento especial a la QFB. Sabina, por formar parte del trabajo como sinodal y por su acompañamiento y amistad durante toda la carrera.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis amigos; Ale, Aletsa, Alexa, Blanca, Carapia, Dani, Fer, Ferroviz, Ivonne, Javi, Juanito, Lili, Moni, Nat, Sergio y Xime. Ustedes han estado a mi lado en cada paso del camino, brindándome su confianza, paciencia y solidaridad. Su amistad ha sido un regalo que ha trascendido el ámbito académico y ha enriquecido mi vida de una manera inimaginable.

Por último quiero agradecer también a los amigos que hice durante este trabajo; Tanya, Ime, Guadalupe, Liz, Juan y Elena. Gracias por hacer este proceso más divertido.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 <i>Mycoplasma</i>	1
1.2 <i>Mycoplasma</i> contaminante.	2
1.3 Cultivo celular.	3
1.3.1 Cultivo celular primario.	3
1.3.2 Desventajas del cultivo celular.	4
1.4 Líneas celulares.	4
1.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	5
1.6 Variantes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	7
1.6.1 PCR Multiplex	7
1.6.2 PCR Anidada	7
1.6.3 RT-PCR	7
1.6.4 Principio del método RT-PCR para detección de <i>Mycoplasma</i> .	9
1.7 ADN Ribosomal 16S	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivo específico	11
3. METODOLOGÍA	12
3.1 Equipo	12
3.2 Materiales	12
3.3 Reactivos y soluciones	12

3.4	Métodos	12
3.4.1	Almacenamiento de muestras para posterior análisis por RT-PCR	12
3.4.2	Inactivación de los cultivos celulares y sus sobrenadantes por calor	13
3.4.3	Reconstitución de reactivos	13
3.4.4	Preparación de la mezcla de reacción y controles	14
3.4.5	Programación de condiciones del termociclador	14
3.4.6	Diseño experimental	14
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	16
6.	CONCLUSIÓN.	30
7.	BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Desventajas del cultivo celular.	5
2. Programación de temperatura del termociclador.	14
3. Interpretación de resultados para un sistema de detección con dos fluoróforos.	21
4. Resultados generales de todas las muestras analizadas.	22
5. Resultados obtenidos de los controles.	24
6. Resultados de líneas celulares proporcionadas por Desarrollo.	26
7. Resultados de líneas celulares proporcionadas por el área de Producción de Biológicos.	27
8. Resultados de líneas celulares con 21, 23 y 39 pases proporcionadas por Producción.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diseño experimental.	14
2. Fotografías tomadas con un microscopio invertido a 10X de los diferentes cultivos celulares utilizados para el ensayo.	18
3. Guía para la selección de colorantes para PCR publicada por Biosearch Technologies en 2021.	20
4. Gráfica de amplificación con los resultados obtenidos de las muestras al realizar la RT-PCR.	23
5. Gráfico de amplificación del control negativo y control positivo.	25
6. Gráfico de amplificación de líneas celulares proporcionadas por el departamento de Investigación y Desarrollo.	26
7. Gráfica de resultados de líneas celulares proporcionadas por el área de Producción de Biológicos.	27
8. Gráfica de resultados de líneas celulares con 21, 23 y 39 pases proporcionadas por Producción.	28

RESUMEN

El cultivo celular es utilizado en la fabricación de vacunas debido a que los virus no pueden producirse de forma independiente y necesitan células para poder multiplicarse. Este proceso se debe realizar bajo condiciones estrictas de esterilidad y asepsia debido a que su crecimiento es más lento que el de sus contaminantes habituales. Éstos contaminantes evitan el crecimiento de los cultivos o afectan inmediatamente la morfología de la línea celular con la que se esté trabajando. El *Mycoplasma* es una bacteria que carece de pared celular y por lo tanto no es sensible a los antibióticos que bloquean la síntesis de la pared celular. Esta bacteria, perteneciente a la clase de *Mollicutes*, crece de manera lenta incluso en condiciones óptimas, por lo cual, es complicado hacer una detección oportuna de una contaminación por *Mycoplasma* en un cultivo celular utilizando los métodos microbiológicos básicos. En los últimos años, una de las técnicas que se ha explotado más dentro de la biología molecular, es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR en tiempo real (RT-PCR) es una de las variantes que presenta esta técnica y con la cual, se implementó un método de detección de *Mycoplasma* contaminante, logrando disminuir 360 veces el tiempo de detección en comparación con el método tradicional y así, poder tener certeza de entregar cultivos celulares en óptimas condiciones para pasar al proceso de una vacuna.

1. ANTECEDENTES

1.1 *Mycoplasma*

A finales del año 1970, los resultados de una variedad de estudios permitieron reconstruir un árbol filogenético de *Mollicutes* cada vez más detallado. El árbol general se basa en análisis de secuencias de ARNr 16S y proporciona un marco para los resultados sobre otras relaciones entre cepas de *Mollicutes*, así como entre *Mollicutes* y bacterias Gram-positivas (Maniloff, 2012).

El *Mycoplasma* es una bacteria perteneciente a la clase de *Mollicutes* cuya característica principal es la carencia de pared celular lo que hace que no sean sensibles a los antibióticos que bloquean la síntesis de la pared celular, como la penicilina u otros antibióticos betalactámicos. También, son considerados como los organismos autorreplicantes más pequeños que se conocen en la actualidad, su tamaño de 0.3 a 0.8 μm de diámetro y la flexibilidad de la membrana celular permiten al *Mycoplasma* atravesar los filtros antibacteriológicos de uso común con diámetro de 0.45 μm (Drexler & Uphoff, 2003).

Los *Mycoplasmas* crecen de manera muy lenta en comparación con otras, teniendo tiempos de generación entre tres y nueve horas incluso en condiciones óptimas. Por esto, puede tomar más de una semana para obtener colonias visibles en agar (Armstrong et al., 2010).

En 2003, Drexler y Uphoff reportaron que existen cinco cepas principales de *Mycoplasma* de las cuales se conoce que son causantes de un 95 % de las infecciones en cultivos celulares en la industria farmacéutica, las cuales son el *M. orale* (20-40 %), *M. hyorhinae* (10-40 %), *M. arginini* (20-30 %), *M. fermentans* (10-20 %) y *M. hominis* (10-20 %). Estas cepas pueden ser un indicador de dónde proviene dicha contaminación ya que el host natural de *M. orale*, *M. fermentans* y *M. hominis* es el hombre, así como el cerdo es el hospedero natural de *M. hyorhinae* y el bovino de *M. arginini* (Drexler & Uphoff, 2003).

1.2 *Mycoplasma* contaminante.

La contaminación por *Mycoplasma* en la industria farmacéutica, especialmente en cultivos celulares, puede escalar a un problema con repercusiones severas en la calidad del producto ya que este produce una gran variabilidad de efectos en los cultivos que estos infecten, no solo por el hecho de que se trata de un patógeno oportunista que puede generar reacciones indeseables en las especies destino, sino que puede repercutir directamente en la pureza de los antígenos obtenidos y en los títulos de los mismos. Esta contaminación no es perceptible o no hace que los cultivos celulares presenten algún aspecto característico, por lo que deben ser examinados de manera frecuente (Sung & Hawkins, 2020).

La infección con *Mycoplasma* tiene diferentes efectos en las líneas celulares contaminadas, lo que significa que esta contaminación no afecta de igual manera o en el mismo grado a todas las células. Muchas especies de *Mycoplasma* producen efectos citopáticos mientras que otros pueden causar muy poca citopatología evidente (Drexler & Uphoff, 2003).

Se tienen establecidos métodos de detección de *Mycoplasma* tradicionales que suelen tardar varios días en arrojar un resultado, como el método descrito en la NOM-036-SSA2-2012 el cual especifica que para la detección de *Mycoplasma* de cada mezcla de vacunas, se inocula 1 mL en 10 mL de medio de Hayflick si las vacunas están elaboradas en líneas celulares. Se mezclan perfectamente y se incuban a 37 °C con atmósfera de 5 % CO₂ y un 95 % de nitrógeno. De la misma vacuna, se inoculan 0.25 mL en 2 cajas de Petri con medio sólido de Hayflick y se incuban a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ y 95 % de nitrógeno (NOM-036-SSA2-2012). En el caso de cultivos celulares, se crecen durante 3 o 4 días en ausencia de antibióticos y se toman alícuotas de 1 mL de caldo SP4 y se incuban a 37 °C durante 20 días. Cada tercer día se vuelven a sembrar 5 µL en agar SP4 y se incuban bajo las mismas condiciones. La identificación se observa por el cambio en el indicador de pH y ausencia de turbidez en el caldo, así como la presencia de las colonias características de *Mycoplasma* en el agar mediante microscopía estereoscópica (Rivera et al., 2011).

1.3 Cultivo celular.

El cultivo celular ha sido, es y seguirá siendo uno de los pilares para la producción de vacunas. En el caso de enfermedades bacterianas, las bacterias, para la producción de sus vacunas, pueden producirse a gran escala de forma independiente en biorreactores y posteriormente ser procesadas para generar las dosis y poder ser utilizadas en clínica. Sin embargo, los virus no pueden producirse de forma independiente y necesitan células para poder multiplicarse. Por lo tanto, los virus destinados a vacunación se cultivan en células (Onscience.es, 2021).

Esta técnica es comúnmente usada para el estudio de la fisiología y metabolismo animal, que no es posible realizar en estudios *in vivo*. Las alternativas son utilizar cortes de tejido y biopsias que conservan la estructura *in vivo*. Sin embargo, estas suelen tener que utilizarse de manera inmediata debido a que su viabilidad celular se mantiene a corto plazo. En cambio, al obtener las células existe la posibilidad de establecer cultivos celulares por días o semanas (Phillipeos et al., 2011).

1.3.1 Cultivo celular primario.

Al establecer un cultivo celular, se seleccionan las células que se harán crecer y solo formarán parte del cultivo las células que logren adherirse al sustrato, superar el proceso de disgregación y de proliferar. Un cultivo primario está constituido por las células aisladas para que puedan proliferar, este se lleva a cabo en condiciones estrictas de esterilidad y con ambiente controlado que involucra temperatura, gases y presión. Esto debido a que debe de imitar el entorno *in vivo* con éxito, para que las células puedan sobrevivir y proliferar de manera controlada (Baust et al., 2017). Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia, al alcanzar la confluencia es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando su morfología y fisiología son más parecidas a su estado original. Por eso, es el momento ideal para examinar el cultivo y, al cabo de un tiempo, hay que realizar un pase para que tengan más espacio para que continúen multiplicándose. (Roldán et al., 2019). Después de un cierto número de pases las células alcanzan la senescencia y son incapaces de seguir multiplicándose.

1.3.2 Desventajas del cultivo celular.

El crecimiento de las células animales se tiene que realizar en condiciones estrictas de esterilidad y asepsia, ya que su crecimiento es mucho más lento que el de los contaminantes que son habituales como los hongos, levaduras, bacterias, entre otros. Además, las células animales son incapaces de mantenerse vivas sin la presencia de los nutrientes que se encuentran en el plasma o en el líquido intersticial. Todo esto condiciona el material e instrumental requerido y el grado de preparación del personal encargado de los cultivos (Roldán et al., 2019). Otra de las desventajas que presenta el cultivo celular es la cantidad y coste, ya que se requieren instalaciones, insumos y equipos costosos (Baust et al, 2017).

Otra desventaja que presentan los cultivos celulares es que muchas líneas celulares continuas son inestables y adoptan una dotación cromosómica aneuploide, lo que afecta tanto a su velocidad de crecimiento como a su capacidad de diferenciarse. Por lo tanto, es posible encontrar diferencias significativas en la línea celular de una generación a la siguiente. Por esto, las líneas celulares se vuelven a sembrar cada determinado tiempo o después de un determinado número de generaciones a partir de un stock congelado (Roldán et al., 2019).

1.4 Líneas celulares.

Algunas de las líneas celulares utilizadas en la industria veterinaria para la creación de vacunas son las células epiteliales de la corteza renal de gato (CRFK), susceptibles al virus de la herpes y el picornavirus felino; la línea celular de riñón canino Madin Darby (MDCK), capaces de producir títulos altos de cepas vacunales vivas atenuadas para un amplio rango de subtipos y variantes de cepas del virus de influenza (Jaime et al., 2011); células de riñón de mono verde africano (VERO) que es susceptible a un amplio rango de virus, lo que la hace la línea más empleada para fabricación de vacunas de poliomieltis y rabia en humanos (Jaime et al., 2011).; línea celular de tumor canino (A-72) que son susceptibles a los adenovirus, coronavirus o distemper y la línea celular riñón de hámster dorado (BHK-21) que son utilizadas en estudios con virus polioma, aftosa, arbovirus y, en especial, ideal para la propagación de virus rábico (Favi et al., 1991).

Cuadro 1. Desventajas del Cultivo Celular (Roldán et al., 2019).

Desventajas del Cultivo Celular	
Categoría	Ejemplos
Experiencia necesaria	Manejo estéril
	Evitar la contaminación química
	Detección de contaminación microbiológica
	Conciencia y detección de fallas
Control ambiental	Aislamiento y limpieza del lugar de trabajo
	Incubación, control de pH
	Contención y disposición de residuos biológicos
Cantidad y costo	Equipo para aumentar la escala
	Suero y medio
	Plásticos desechables
Inestabilidad genética y fenotípica	Heterogeneidad, variabilidad
	Desdiferenciación
	Adaptación
	Crecimiento excesivo selectivo
Identificación del tipo de célula	Marcadores no siempre expresados
	Histología atípica y difícil de recrear

En la actualidad se sintetiza una gran variedad de productos farmacéuticos utilizando cultivos celulares en instalaciones de fabricación a gran escala que producen productos tanto para su comercialización como para investigación (Feng et al., 2010).

1.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La ciencia y la tecnología han avanzado de manera conjunta de tal modo que nos han proporcionado nuevos equipos y métodos de detección más eficientes en cuanto a tiempo, calidad y especificidad. Una de las técnicas dentro de la biología molecular que más se ha explotado en estos últimos años es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta, es una técnica para la síntesis “in vitro” de secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN), por lo que rápidamente

puede multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de ADN (Aguilera, 2014).

La PCR es una metodología resultante de la aplicación de tres conceptos: desnaturalización del ADN para dar moléculas monocatenarias; hibridación específica de la molécula monocatenaria con un oligonucleótido; y replicación de la molécula monocatenaria mediante una enzima (ADN polimerasa) que emplea el oligonucleótido anterior como cebador (Herraez, 2012).

Se requiere un control preciso de las variables que condicionan este proceso (secuencia diana, cebadores, enzimas y resto de componentes), además de equipos como los termocicladores que establece con precisión las condiciones de cada etapa y que son repetidas cíclicamente (Rubio et al., 2011).

Para la mezcla de reacción de una PCR convencional, se requieren los siguientes reactivos: los cuatro desoxinucleótidos (dNTP) en exceso, que son monómeros que constituyen el ADN con la misma estructura de los nucleótidos (Nelson et al., 2021) y, por tanto, funcionan como sustratos para la síntesis de las innumerables copias de ADN. Para que sean reconocidos por la polimerasa, deben ir acompañados de Mg^{2+} que además es una coenzima que requiere la polimerasa; Dos oligonucleótidos monocatenarios con secuencias complementarias a los dos extremos 3' de la región diana, de modo que los oligonucleótidos puedan ejercer de cebadores para la replicación de las dos hebras en la región diana; y una ADN polimerasa termoestable, que sea enzimáticamente activa a temperaturas relativamente altas (75 °C) para contribuir con la especificidad y rendimiento del proceso (Herraez, 2012).

Se requiere una sucesión de ciclos generalmente entre 20 y 40, de 1.5 a 5 minutos de duración cada uno formados por desnaturalización, hibridación y replicación para poder conseguir una amplificación del número de moléculas que contienen la secuencia de interés (Herraez, 2012). Por lo tanto, cada ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, que es el calentamiento para la separación de las dos hebras de ADN mediante una breve incubación (30-120 segundos) a una

temperatura entre 68 y 97 °C; hibridación, que es el enfriamiento rápido por debajo de la temperatura de fusión (generalmente 37 y 65 °C) de manera que permite el emparejamiento del ADN monocatenario de interés con los oligonucleótidos cebadores; y elongación, que es la etapa de amplificación en la que la ADN polimerasa termoestable elonga a los dos cebadores, empleando como molde ambas hebras originales (Herraez, 2012).

1.6 Variantes de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

1.6.1 PCR Multiplex

Dentro de este ámbito, se han desarrollado algunas otras variantes tales como la PCR Multiplex, que es aquella que en el proceso de amplificación participan más de dos iniciadores amplificando en un único tubo varias secuencias dianas, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes (Méndez-Álvarez, 2004).

1.6.2 PCR Anidada

PCR anidada que aumenta la especificidad realizando una segunda reacción de PCR con dos cebadores nuevos que hibridan dentro del fragmento diana amplificado por el primer par, lo que da lugar a productos de PCR (amplicones) más cortos, pero más específicos (Herraez, 2012).

1.6.3 RT-PCR

La RT-PCR o qPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) es una técnica que combina la amplificación y la detección al correlacionar los productos de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de fluorescencia (Brechtbuehl et al., 2001). Esta variante mide la velocidad a la que se va amplificando el ADN ya que el planteamiento cinético de la qPCR consiste en medir no la cantidad de producto final sino la velocidad a la que se están formando en momentos moderadamente tempranos de la reacción. La alta especificidad, el amplio rango de detección y la rapidez en la visualización de los resultados son las características más importantes que presenta esta técnica (Herraez, 2012).

Para la amplificación por RT-PCR además de los reactivos que se utilizan comúnmente en la PCR punto final (polimerasa, cebadores, dNTP y reactivos de tamponamiento), se emplea un fluoróforo (Wong y Medrano, 2005).

Existen dos tipos de fluoróforos utilizados para seguir la amplificación del ADN durante la RT-PCR: los fluoróforos con afinidad por el ADN y las sondas específicas para fragmentos del ADN.

Los fluoróforos con afinidad por el ADN, que emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. La intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN de doble cadena. Por esto, mientras más ADN de doble cadena haya en el tubo de reacción, mayores serán la unión y la señal de fluorescencia del fluoróforo. Este sistema es muy económico y permite el empleo de un solo fluoróforo para diferentes ensayos. Sin embargo, presenta algunas desventajas ya que no es posible hacer reacciones múltiples, además de que la señal emitida no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier producto amplificado de la PCR, por lo que es obligatorio verificar la especificidad de la señal, analizar la curva de disociación y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se debe solo a la amplificación del blanco (Lutfalla et al., 2006).

Las sondas específicas para fragmentos del ADN o que solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interés se pueden dividir en tres tipos: sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla. Todas se basan en el principio “transferencia de energía de resonancia de fluorescencia” (FRET), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador), los cuales emiten energía de fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el apagador se encuentran próximos, el apagador absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando este par de moléculas se separa, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector (Valasek et al., 2006).

Las sondas Taqman son sondas de hidrólisis que están diseñadas para incrementar la especificidad de la qPCR. Estas se basan en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para cortar una zona marcada ya hibridada a la secuencia diana y este corte permite la emisión de fluorescencia por lo que, la fluorescencia detectada en el termociclador es directamente proporcional a la del fluoróforo liberado y la cantidad de ADN molde presente en la PCR (Thermo Fisher Scientific, s.f.). Los ensayos de expresión génica constan de un par de cebadores de PCR sin marcar y una sonda TaqMan con una etiqueta de colorante (FAM) en el extremo de 5' y unión al surco menor y supresor no fluorescente en el extremo 3' (Thermo Fisher Scientific, s.f.).

El termociclador debe incluir una unidad capaz de detectar señales fluorescentes, de manera especial para este caso los canales de FAM y ROX, un tinte fluorescente inerte, lo que lo hace un tinte pasivo a diferencia de los tintes indicadores como FAM, para poder monitorear el progreso de la amplificación, además de tener un software para la captura y análisis de datos. Este equipo debe mantener una temperatura semejante para todas las muestras y poder realizar una transición de temperaturas de una etapa a otra de manera rápida y efectiva. La fuente de energía que proporciona luz para excitar los fluoróforos puede provenir de una lámpara de tungsteno, una resistencia o un láser (Aguilera, 2014).

1.6.4 Principio del método RT-PCR para detección de *Mycoplasma*.

El Kit de detección de *Mycoplasma* de Sartorius permite realizar ensayos para la detección de *Mycoplasma* con cualquier tipo de termociclador para RT-PCR capaz de detectar los tintes fluorescentes de FAM y ROX, además, para llevar a cabo la prueba no es necesario que las muestras contengan *Mycoplasma* vivo.

El *Mycoplasma* es detectado mediante la amplificación de ARN ribosómico (ARNr) altamente conservado, de manera más precisa, en una región codificante de 16S ARNr en su genoma. Esta amplificación es detectada a 520 nm (canal de FAM) mientras que los resultados falsos negativos debido a inhibidores PCR o una extracción de ADN impropia son detectados por el control interno de amplificación a

610 nm (canal de ROX). ROX, también conocido como carboxirodamina, es un tinte fluorescente inerte que se puede agregar a la mezcla maestra de RT-PCR. A diferencia de los tintes indicadores en RT-PCR, ROX se conoce como un tinte pasivo, ya que su señal de fluorescencia no se ve influenciada por las reacciones de PCR. En otras palabras, la señal fluorescente de ROX permanece estable durante todo el proceso de RT-PCR y no está relacionada con la cantidad de plantilla en la reacción (LabNet, 2022).

Los cultivos celulares y sus sobrenadantes son muestras ideales para ser analizadas con este ensayo y sin la necesidad de realizar alguna preparación previa de las muestras. Estos deben ser analizados preferentemente cuando alcancen entre 80 y 90 % de confluencia. Las muestras que arrojan un resultado positivo, como cultivos celulares o sus sobrenadantes, contienen títulos promedio de 10^6 partículas de *Mycoplasma*/mL y títulos máximos de 10^8 partículas de *Mycoplasma*/mL. En estas condiciones hay suficiente ADN disponible para la PCR, incluso para especies asociadas a la membrana celular o en una rara eventualidad de contaminación intracelular.

1.7 ADN Ribosomal 16S

La identificación molecular para bacterias que mediante métodos microbiológicos tradicionales resulta complicada o requiere mucho tiempo se basa en el ADNr 16S. El ribosoma 16S contiene regiones altamente conservadas con secuencias similares entre distintas especies y regiones variables con secuencias únicas de cada especie, esto lo convierte en una herramienta útil para la identificación de microorganismos (An et al., 2022).

Mediante el uso de la RT-PCR, se plantea implementar un método de identificación cualitativo para detectar *Mycoplasma* contaminante en una fase temprana del cultivo celular, específicamente antes de que este cultivo pase a la etapa de producción de vacunas, disminuyendo de esta manera el tiempo de detección, el material a utilizar y la confiabilidad del resultado en comparación con el método tradicional.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Implementar la técnica de RT-PCR para la detección de *Mycoplasma spp* en muestras de cultivo celular de las líneas CRFK, MDCK, VERO, BHK-21 y A-72.

2.2 Objetivo específico

Determinar mediante RT-PCR si existe la presencia de *Mycoplasma* contaminante en alguna de las líneas celulares a evaluar.

3. METODOLOGÍA

3.1 Equipo

- Termociclador LigthCycler Roche
- Microcentrifuga
- Campana de flujo laminar

3.2 Materiales

- Guantes de nitrilo
- Tubos de PCR de 200 μ L
- Gradilla para tubos PCR
- Micropipetas de 20 μ L y 200 μ L
- Puntas nuevas estériles
- Tubos Eppendorf estériles

3.3 Reactivos y soluciones

- Microsart RESEARCH Mycoplasma. Kit de detección de *Mycoplasma* por qPCR. SARTORIUS.
 - a) Mycoplasma Mix (tapa roja)
 - b) Control Positivo ADN (tapa verde)
 - c) Buffer de rehidratación (tapa azul)
 - d) Agua grado PCR (tapa blanca)
- Alcohol 96 %
- Sobrenadante de cultivo celular de células de riñón felino Crandell-Rees (CRFK), células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), células epiteliales de riñón de un mono verde africano (VERO), células de riñón de hámster dorado (BHK-21) y células de tumor canino (A-72).

3.4 Métodos

3.4.1 Almacenamiento de muestras para posterior análisis por RT-PCR

Las muestras de los cultivos celulares y sus sobrenadantes serán proporcionadas por un Laboratorio de Investigación. Estas muestras deberán contar con una

confluencia no menor al 80 %, manteniéndose bajo incubación a 37 °C con una atmósfera reductora de CO₂ al 5 %. Deberán estar etiquetadas con el tipo de línea celular que contienen, el número de pase y la fecha en la que se realizó.

Las muestras obtenidas de cultivos celulares contienen DNAsas que pueden degradar el ADN del *Mycoplasma* incluso a bajas temperaturas, por lo que, si la PCR no puede ser procesada inmediatamente después de la recolección de la muestra, se deben inactivar por calor. Las muestras pueden ser almacenadas a una temperatura ≤ -18 °C antes de la inactivación. Se recomienda hacer la inactivación por calor inmediatamente después de descongelar. Los extractos de ADN y muestras inactivadas por calor pueden ser almacenados entre 2 y 8 °C por 6 días.

3.4.2 Inactivación de los cultivos celulares y sus sobrenadantes por calor

Para realizar la inactivación por calor se colocarán 500 μ L del cultivo o sobrenadante de cultivo celular en un tubo Eppendorf, asegurándose de sellar bien la tapa para prevenir que esta no se abra con la temperatura. Posteriormente se incubarán a baño María a 95 °C por 10 minutos. Al finalizar, se centrifugará la muestra durante 5 segundos a 13000 x g para precipitar los desechos celulares.

Las muestras inactivadas por calor solo se pueden utilizar después de la centrifugación. Este paso es crítico para evitar las interferencias de matriz en la sensibilidad de la prueba.

3.4.3 Reconstitución de reactivos

Se centrifugarán todos los componentes liofilizados en una microcentrífuga durante 5 segundos a 13000 x g. Al tubo con el *Mycoplasma* Mix, se le añadirán 600 μ L de buffer de rehidratación. Al tubo con el control positivo se le añadirán 300 μ L de agua grado PCR. En seguida, tanto el control positivo como el *Mycoplasma* Mix se incubarán por 5 minutos a temperatura ambiente y se colocarán en el vórtex brevemente y se centrifugarán por 5 segundos más.

3.4.4 Preparación de la mezcla de reacción y controles

Se añadirán 23 μL de Mycoplasma Mix rehidratado a cada tubo de PCR. Para los controles negativos se añadirán 2 μL de agua grado PCR, para la reacción de la muestra se agregarán 2 μL de sobrenadante de cultivo celular inactivado por calor y para el control positivo se añadirán 2 μL de control positivo de ADN. Todos los tubos deberán cerrarse herméticamente y centrifugar brevemente todos los tubos.

3.4.5 Programación de condiciones del termociclador

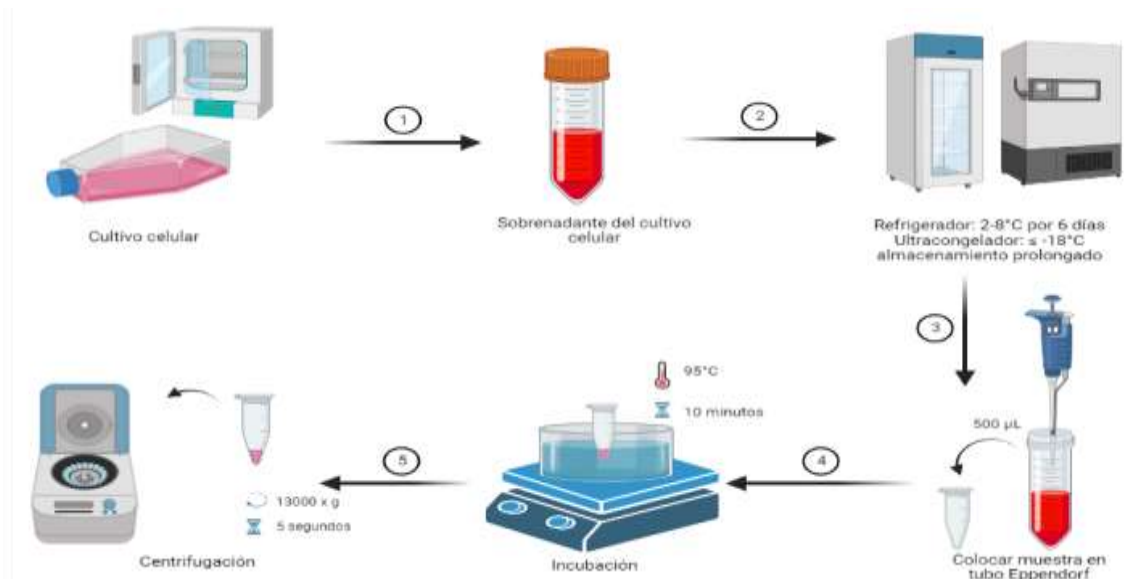
El termociclador se programará como lo muestra el Cuadro 2.

Cuadro 2. Programación de temperatura del termociclador.

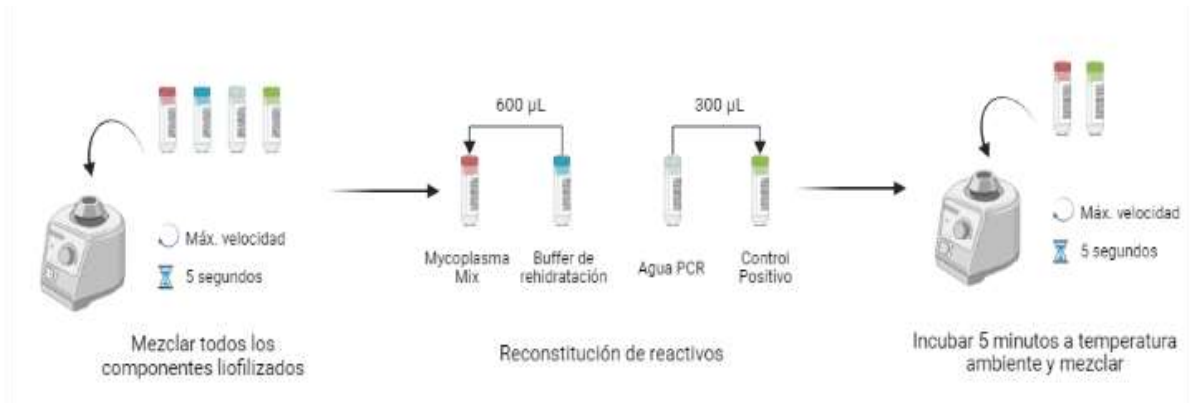
Programación de temperatura del termociclador.	
1 ciclo	95 °C por 3 minutos
45 ciclos	95 °C por 30 segundos
	55 °C por 30 segundos
	60 °C por 45 segundos (recolección de datos)

3.4.6 Diseño experimental

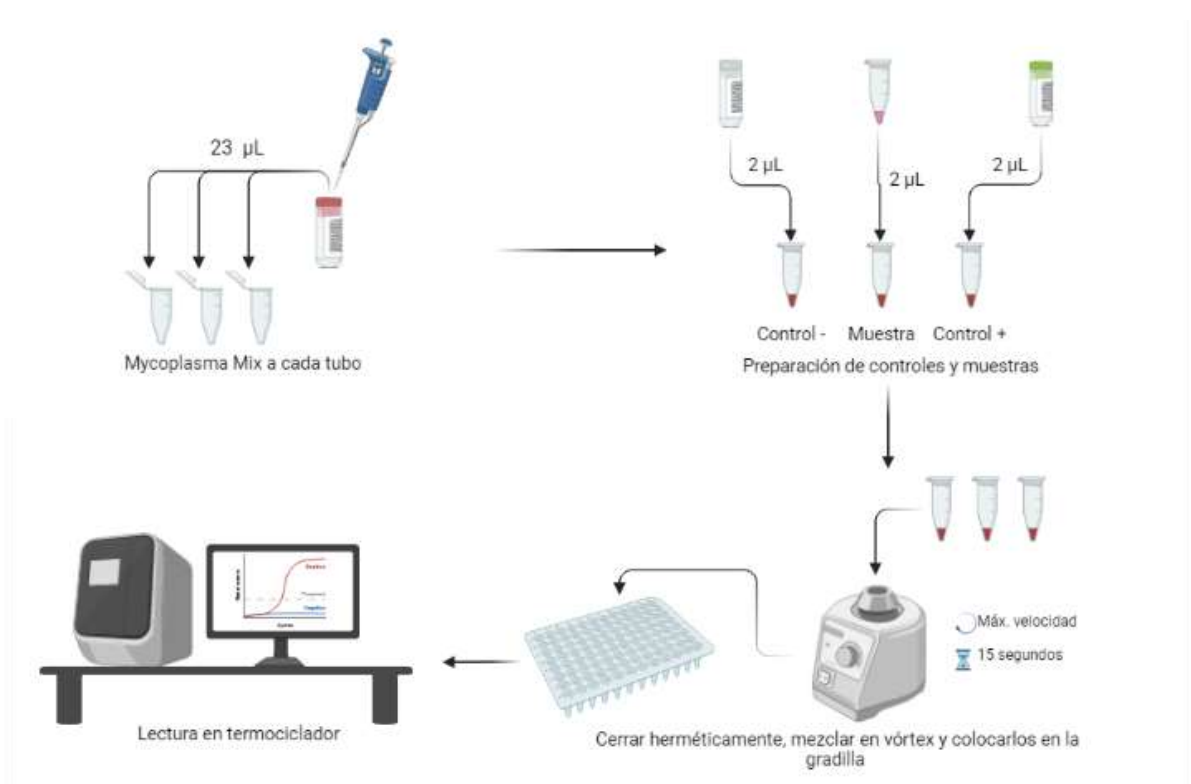
Inactivación por calor



Reconstitución de reactivos



Preparación de la mezcla de reacción y controles



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La industria farmacéutica que utiliza cultivos celulares para la producción de vacunas debe hacer un análisis periódico para la detección de *Mycoplasma* en cultivos o bancos de semillas maestras, así como en vacunas a granel, ya que cuando existe contaminación por medio de estos microorganismos en la producción de la vacuna, se puede afectar su calidad y el rendimiento de las proteínas de la misma (Merck, 2023). Estas contaminaciones dentro de una planta farmacéutica pueden generar grandes pérdidas económicas y de tiempo.

La contaminación por *Mycoplasma* es extremadamente difícil de detectar ya que no suele afectar el pH ni generar turbidez en los medios de cultivo. Por este motivo, las industrias farmacéuticas deben establecer controles periódicos para detectar la presencia de estos *Mollicutes*.

El laboratorio que proporcionó las muestras a evaluar en este proyecto cuenta con dos departamentos que se dedican a la producción de vacunas; el área de Producción de Biológicos y el área de Investigación y Desarrollo. Debido a esto, se obtuvieron muestras de cultivos celulares utilizadas en el proceso de ambas áreas. Estas muestras fueron entregadas con un 85 % de confluencia para realizar la inactivación por calor.

El Kit para detección de *Mycoplasma* de Sartorius, indica que es necesario realizar una inactivación por calor de todas las muestras para desactivar y desnaturalizar cualquier ribonucleasa que pueda estar presente, ya que estos compuestos pueden degradar el ARN que contenga la muestra, lo que ocasionaría una interferencia en el análisis y detección del material genético en cuestión. Batejât y colaboradores en 2021 publicaron un estudio respecto al efecto de la temperatura en relación al tiempo de este tipo de inactivaciones, siendo la más óptima a 95 °C ya que a esta temperatura bastaron 3 minutos para la inactivación de virus en muestras nasofaríngeas (Batejât, et al, 2021). El protocolo analítico del Kit para detección de *Mycoplasma* de Sartorius, indica que es necesaria una inactivación a 95 °C

durante 10 minutos para poder realizar la evaluación mediante RT-PCR en condiciones óptimas de bioseguridad.

Se utilizaron en total 9 muestras de cultivo celular (líneas celulares evaluadas: MDCK, VERO, CRFK, BHK-21 y A-72), proporcionadas por las áreas ya mencionadas de un laboratorio dentro de una industria farmacéutica. En la Figura 2 se presentan imágenes de los cultivos celulares de las muestras proporcionadas, obtenidas por un microscopio invertido a 10X con el cual se monitorea de manera constante el estado, crecimiento y confluencia de cultivos celulares. Estos análisis de crecimiento y confluencia son fundamentales para determinar su viabilidad, funcionalidad y proliferación de los cultivos celulares (Roldán et al., 2019). En la Figura 2, se observa que los cultivos de cada una de las líneas celulares evaluadas presentaban una confluencia superior a 85 %, se puede apreciar la distinta morfología característica de cada uno de los cultivos y la ausencia turbidez en todas las imágenes, lo que nos indica que aparentemente son cultivos celulares en óptimas condiciones para utilizar en producción y, por tanto, para ser evaluadas (Roldán et al., 2019).

En adición a esto, como parte del planteamiento del proyecto, se tomó una alícuota del Medio Esencial Mínimo (MEM) que es utilizado en el tratamiento de los cultivos celulares, para corroborar que no exista contaminación por *Mycoplasma* en el medio.

Las nueve muestras de cultivo celular y la muestra del MEM fueron inactivadas por calor y almacenadas a 4 °C durante su transporte a la Unidad de Servicios Clínicos y Diagnóstico Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro (USCyDM, UAQ). Durante el traslado, se monitoreaba de manera constante que la temperatura se mantuviera a 4 °C ± 2 °C.

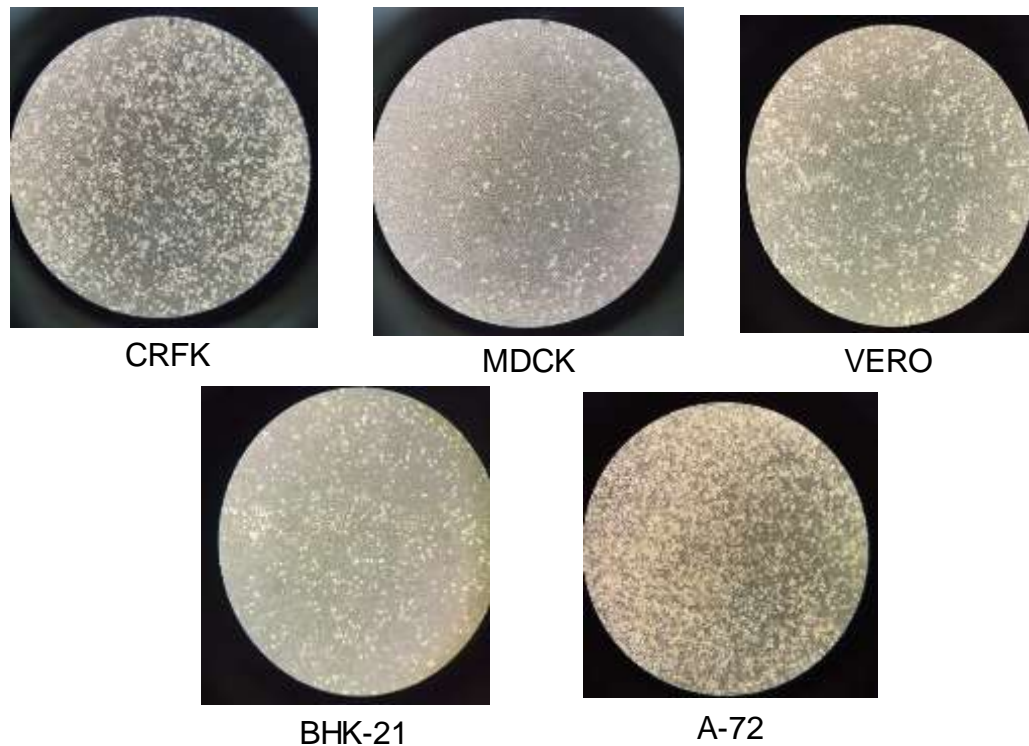


Figura 2. Fotografías tomadas con un microscopio invertido a 10X de los diferentes cultivos celulares utilizados para el ensayo.

Tradicionalmente para realizar una RT-PCR se requiere una extracción y purificación de ARN total que implica mucho tiempo y recursos materiales. Sin embargo, en 2018, Klebe y colaboradores publicaron un informe que demuestra que se puede evitar por completo la extracción de ARN. En su artículo “RT-PCR Without RNA Isolation” se describe un método para lisar células conservando el ARN, este método implica congelar rápidamente las células en presencia de un inhibidor de la ribonucleasa más ditiotreitól y utilizando extractos de 250 células directamente en el ensayo de RT-PCR. Este procedimiento evita el uso de reactivos agresivos, que pueden inhibir las enzimas implicadas en la RT-PCR y produce resultados prácticamente idénticos a los métodos que emplean tiocianato de guanidinio y fenol para la extracción de ARN (Klebe et al., 2018).

LightCycler 96 que, en cuanto a rendimiento para una RT-PCR, ofrece los más altos estándares que se esperan de cualquier sistema LightCycler. Este equipo proporciona un termociclado de precisión, con homogeneidad en la temperatura y reproducibilidad, así como un potente software accesible para los usuarios (Hoffmann-Roche, 2023), el cual, permite obtener resultados confiables en menos de una hora. En conjunto con el kit de Detección de *Mycoplasma* de Sartorius, este método proporciona la capacidad de hacer una prueba de detección de Mycoplasma en cultivo celular en 2 horas, contemplando únicamente la preparación de la Master mix y la RT-PCR, esto es 360 veces más rápido que el método tradicional (30 días).

Los ensayos se realizan mediante un sistema de detección con dos fluoróforos, los cuales utilizan colorantes fluorescentes para detectar directamente los amplicones de PCR, lo que evita la necesidad de una manipulación posterior a la amplificación. Una serie de sondas de ADN, cada una específica para un microorganismo, marcadas con diferentes tintes de fluorescencia como lo son FAM y ROX, se pueden utilizar de manera simultánea para señalar la presencia de objetivos específicos resueltos por los filtros del instrumento, lo que permite la detección de los productos de la PCR después de 20 a 45 ciclos (Dullaert-de Boert et al., 2018). Sin embargo, el termociclador LightCycler 96 no cuenta con el canal de ROX, por lo que se optó por utilizar el canal de Red610, ya que como se puede observar en la Figura 3 tomada de Biosearch Technologies, este tinte fluorescente cuenta con unas longitudes de onda de emisión y excitación muy similares a ROX, lo cual lo hace la mejor opción para correr el ensayo en el termociclador Roche LightCycler 96. Así mismo, en esta Figura también nos indica que el canal de FAM tiene los valores de excitación y emisión en 495 nm y 520 nm respectivamente.

Fluorophore	Alternate dyes	DYE-5' - T ₁₀		Recommended quencher	BHQ™ dye quenching range
		Excitation	Emission		
○ Blosearch Blue™		356	454	BHQ-1	BHQ-0 430-520 nm
FAM		495	520	BHQ-1	
TET		521	536	BHQ-1	
○ CAL Fluor™ Gold 540	VIC/TET/JOE	522	544	BHQ-1	
○ CIV-550™	VIC	530	550	BHQ-1	
VIC	CIV-550/CAL Fluor Orange 560	530	550		
JOE		529	555	BHQ-1	
HEX		535	556	BHQ-1	
○ CAL Fluor Orange 560	VIC/HEX/JOE/CIV-550	538	559	BHQ-1	BHQ-1 480-580 nm
○ Quasar™ 570	Cy 3	548	566	BHQ-2	
Cy™3		549	566		
TAMRA		557	583	BHQ-2	
○ CAL Fluor Red 590	TAMRA	569	591	BHQ-2	BHQ-2*
ROX™		588	610	BHQ-2	
○ CAL Fluor Red 610	Texas Red/ROX/Alexa Fluor® 594	590	610	BHQ-2	
Cy 3.5		594	612		
Texas Red®		597	616		
LC Red® 640		619	637		
○ CAL Fluor Red 635	LC® Red 640	618	637	BHQ-2	
Cy 5		646	669		
○ Quasar 670	Cy 5	647	670	BHQ-2*, BHQ-3	
○ Quasar 705	Cy 5.5	690	705	BHQ-2*, BHQ-3	BHQ-3 620-730 nm
Cy 5.5		694	711		

Figura 3. Guía para la selección de colorantes para PCR publicada por Biosearch Technologies en 2021. Resaltado verde las características de FAM y en rojo la similitud de ROX y Red610.

Durante la reacción de RT-PCR, el reportero primero es excitado y su señal de emisión es colectada a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda correspondiente, este llega hasta un fotodetector que captura la información en el software del equipo (Tamay et al, 2013), dependiendo de la longitud a la que el reportero sea excitado y emitido obtendremos un resultado positivo o negativo de la prueba.

El ciclo de cuantificación (Cq) es el número fraccionario de ciclos que se necesitaron para que la fluorescencia alcanzara un umbral de cuantificación (Ruíz-Villalba et al., 2021). Esto significa que, si el equipo otorga un valor de Cq en el en

el canal de FAM y no otorga valor de Cq en Red610, es señal de que existe una amplificación y, por lo tanto, un resultado positivo; Cabe resaltar que las muestras en las que el FAM no supera el valor umbral, antes de que se consideren negativas se debe comprobar el valor para el Red610, ya que para poder descartar algún problema de inhibición se debe corroborar que el valor de Cq sea menor al del control blanco (NTC), de lo contrario, el resultado será que la RT-PCR está inhibida (Microbial, s.f.). El Cuadro 3 resume la interpretación de los resultados que se pueden obtener utilizando este sistema de detección con dos fluoróforos.

Cuadro 3. Interpretación de resultados para un sistema de detección con dos fluoróforos.

Detector de <i>Mycoplasma</i> (FAM)	Detector control (Red610)	Interpretación
Supera el umbral.	Irrelevante	Muestra positiva.
No supera el umbral.	Supera el umbral, sin retraso respecto al NTC.	Muestra negativa.
No supera el umbral.	No supera el umbral / retraso respecto al NTC.	Muestra inhibida.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de manera general de las muestras proporcionadas, esto incluye las muestras problema, el control positivo y negativo, y una muestra del Medio Esencial Mínimo utilizado para la expansión y mantenimiento de los cultivos celulares utilizados. El código de colores asignado se utilizó para separar las muestras dependiendo su origen y características: verde para control positivo, rojo para control negativo, naranja para las muestras del departamento de Investigación y Desarrollo, morado únicamente para el MEM ya que no contiene células o sobrenadante celular, gris para células utilizadas en

Producción de Biológicos mayores a 20 pases y azul para células utilizadas en los procesos de Producción de Biológicos.

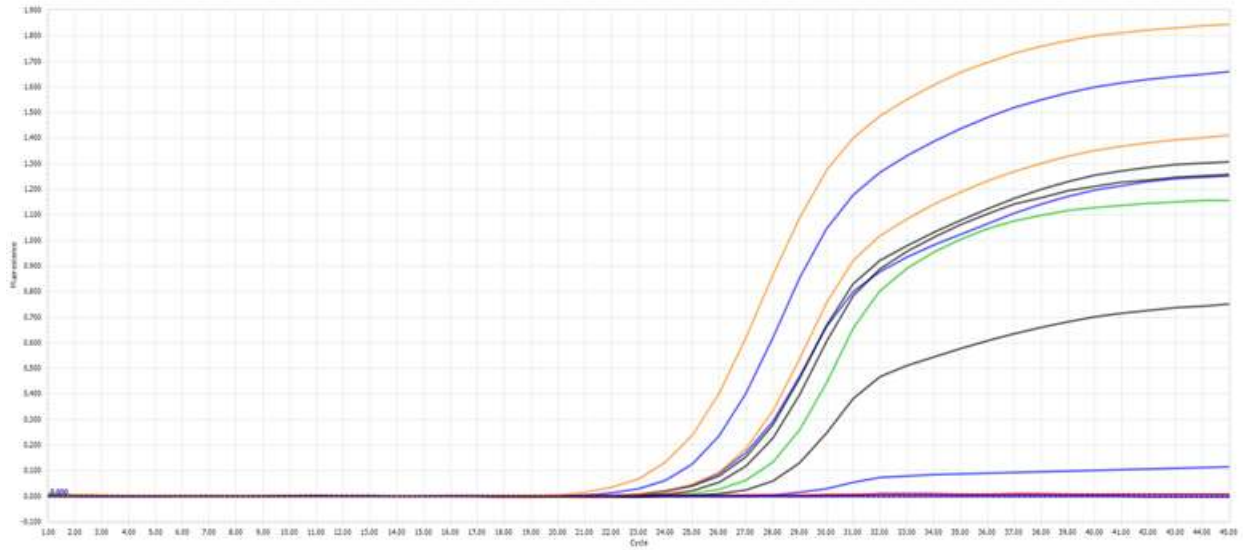
Cuadro 4. Resultados generales de todas las muestras analizadas.

Color	Nombre de la muestra	Cq	Resultado por tinte	Tinte	Slope	EPF	Resultado RT-PCR
	CTRL -	-	Negativo	FAM	0.00	0.01	Negativo
	CTRL -	29.16	Positivo	Red610	0.18	1.08	
	CTRL +	26.90	Positivo	FAM	0.20	1.16	Positivo
	CTRL +	25.50	Positivo	Red610	0.17	0.90	
	CRFK-D	25.34	Positivo	FAM	0.21	1.42	Positivo
	CRFK-D	-	Negativo	Red610	0.02	0.13	
	MDCK-D	22.62	Positivo	FAM	0.24	1.85	Positivo
	MDCK-D	-	Negativo	Red610	0.01	0.06	
	MEM	-	Negativo	FAM	0.00	0.00	Negativo
	MEM	29.01	Positivo	Red610	0.12	0.87	
	MDCK-P21	26.08	Positivo	FAM	0.20	1.26	Positivo
	MDCK-P21	-	Negativo	Red610	0.09	0.50	
	VERO-P23	27.93	Positivo	FAM	0.13	0.76	Positivo
	VERO-P23	-	Negativo	Red610	0.11	0.61	
	CRFK-P39	25.5	Positivo	FAM	0.20	1.31	Positivo
	CRFK-P39	-	Negativo	Red610	0.13	0.82	
	BHK-21	-	Negativo	FAM	0.00	0.01	Negativo
	BHK-21	28.65	Positivo	Red610	0.17	1.18	
	CRFK	25.16	Positivo	FAM	0.18	1.25	Positivo
	CRFK	-	Negativo	Red610	0.08	0.48	
	MDCK	-	Negativo	FAM	0.02	0.11	Negativo
	MDCK	28.83	Positivo	Red610	0.14	0.92	
	A-72	23.83	Positivo	FAM	0.23	1.67	Positivo
	A-72	-	Negativo	Red610	0.07	0.47	

Cq (Quantification Cycle): Ciclo de cuantificación

EPF (Efficiency Plateau Fluorescence): Eficiencia de la PCR

Gráfico de amplificación.



Resultados RT-PCR

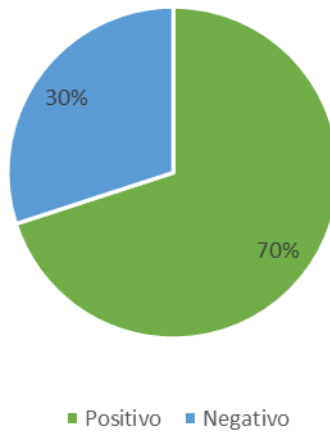


Figura 4. Gráfica de amplificación con los resultados obtenidos de las muestras al realizar la RT-PCR (arriba) y gráfico de pastel con los porcentajes de muestras positivas (verde) y muestras negativas (azul) dentro del ensayo (abajo).

En la Figura 4, se muestra el gráfico de amplificación proporcionado por el termociclador Roche LightCycler 96, en el cual, se presenta una relación entre la cantidad de fluorescencia (eje de las ordenadas) y los ciclos de la reacción (eje de las abscisas). La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es directamente proporcional al aumento del ADN (Tamay et al., 2013). Esta curva de amplificación consta de una fase inicial, donde la fluorescencia permanece por debajo del límite de detección del termociclador, seguida de una fase exponencial donde hay un incremento de la fluorescencia y una tercera parte donde la fluorescencia arrojada por la reacción se estabiliza, esto señala el final de la reacción. El punto donde intercepta una curva de amplificación con el umbral se llama Threshold Cycle (Ct). Mientras más ADN contenga la muestra problema, este punto será alcanzado con un menor número de ciclos.

Cuadro 5. Resultados obtenidos de los controles

Color	Nombre de la muestra	Cq	Resultado por tinte	Tinte	Resultado RT-PCR
Red	CTRL -	-	Negativo	FAM	Negativo
Red	CTRL -	29.16	Positivo	Red610	
Green	CTRL +	26.90	Positivo	FAM	Positivo
Green	CTRL +	25.50	Positivo	Red610	

Control Negativo



Control Positivo

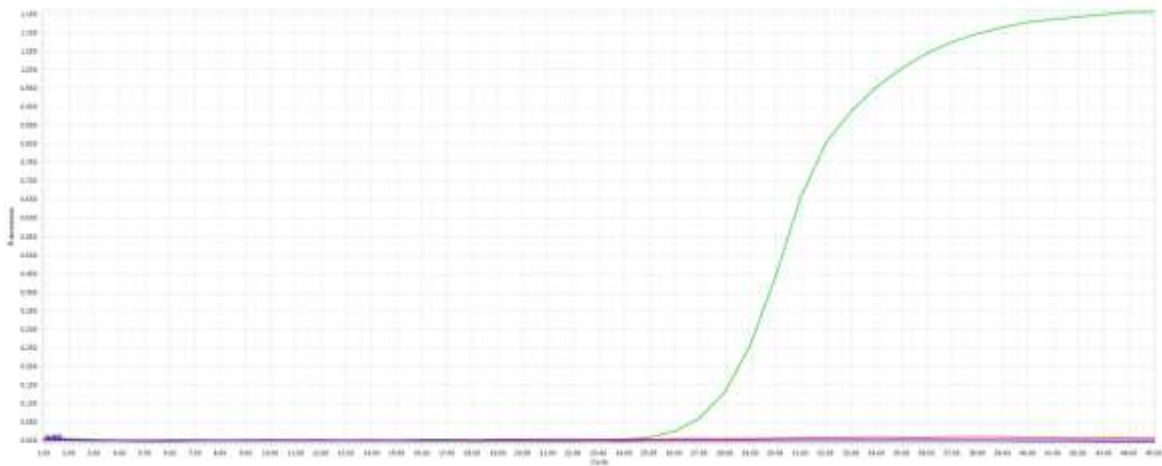


Figura 5. Gráfico de amplificación (fluorescencia en relación al ciclo en el que amplifica) del control negativo (arriba) y control positivo (abajo).

El umbral en el termociclador se colocó exactamente en el 0, por lo que el equipo detecta aún el ruido de fondo. Se consideró esta situación al momento de analizar los gráficos de amplificación para determinar un umbral por encima del ruido y donde la señal aún es lineal y proporcional a la cantidad de ADN en las muestras.

Cuadro 6. Resultados de líneas celulares proporcionadas por Desarrollo.

Color	Nombre de la muestra	Cq	Resultado por tinte	Tinte	Resultado RT-PCR
1	CRFK-D	25.34	Positivo	FAM	Positivo
1	CRFK-D	-	Negativo	Red610	
2	MDCK-D	22.62	Positivo	FAM	Positivo
2	MDCK-D	-	Negativo	Red610	

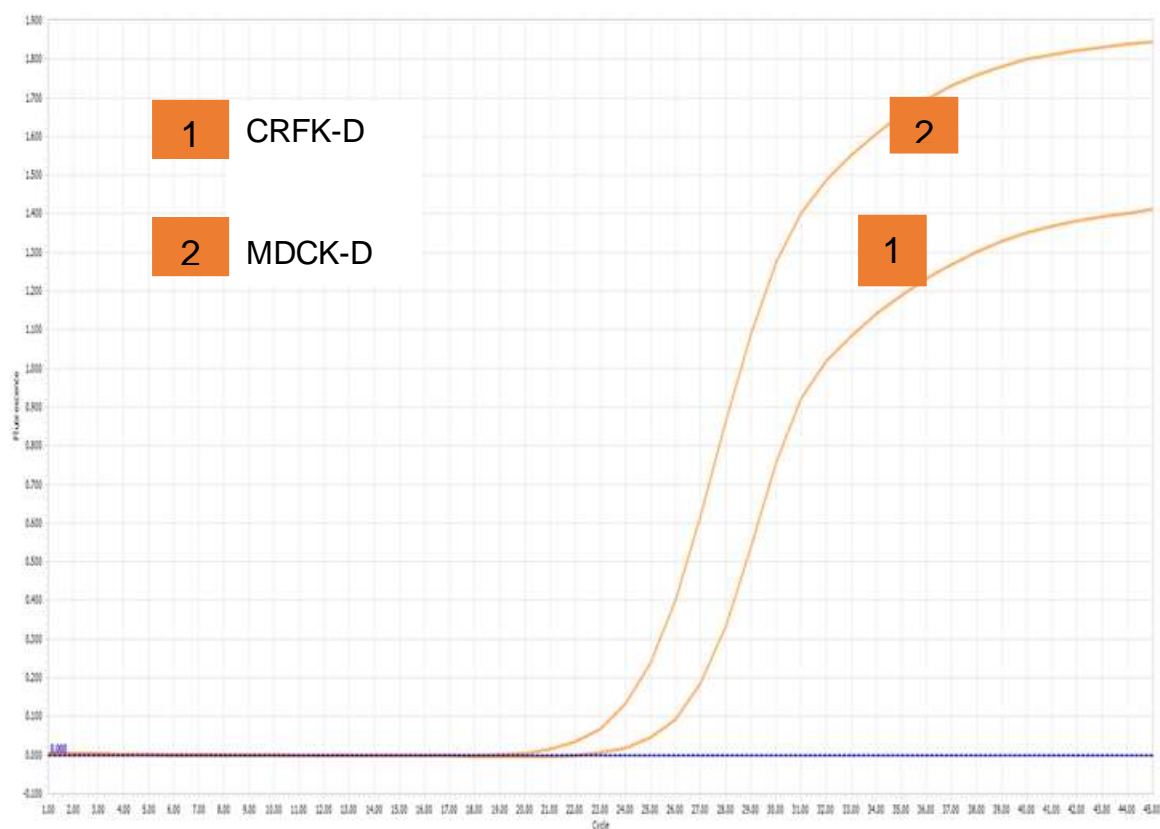


Figura 6. Gráfico de amplificación de líneas celulares proporcionadas por el departamento de Investigación y Desarrollo.

En la Figura 6 se observan ambas muestras positivas amplificando con el canal FAM a partir del ciclo 25.34 para CRFK-D y 22.62 para MDCK-D lo que indica que ambas muestras son positivas a *Mycoplasma*.

Cuadro 7. Resultados de líneas celulares proporcionadas por el área de Producción de Biológicos.

Color	Nombre de la muestra	Cq	Resultado por tinte	Tinte	Resultado RT-PCR
1	BHK-21	-	Negativo	FAM	Negativo
1	BHK-21	28.65	Positivo	Red610	
2	CRFK	25.16	Positivo	FAM	Positivo
2	CRFK	-	Negativo	Red610	
3	MDCK	-	Negativo	FAM	Negativo
3	MDCK	28.83	Positivo	Red610	
4	A-72	23.83	Positivo	FAM	Positivo
4	A-72	-	Negativo	Red610	

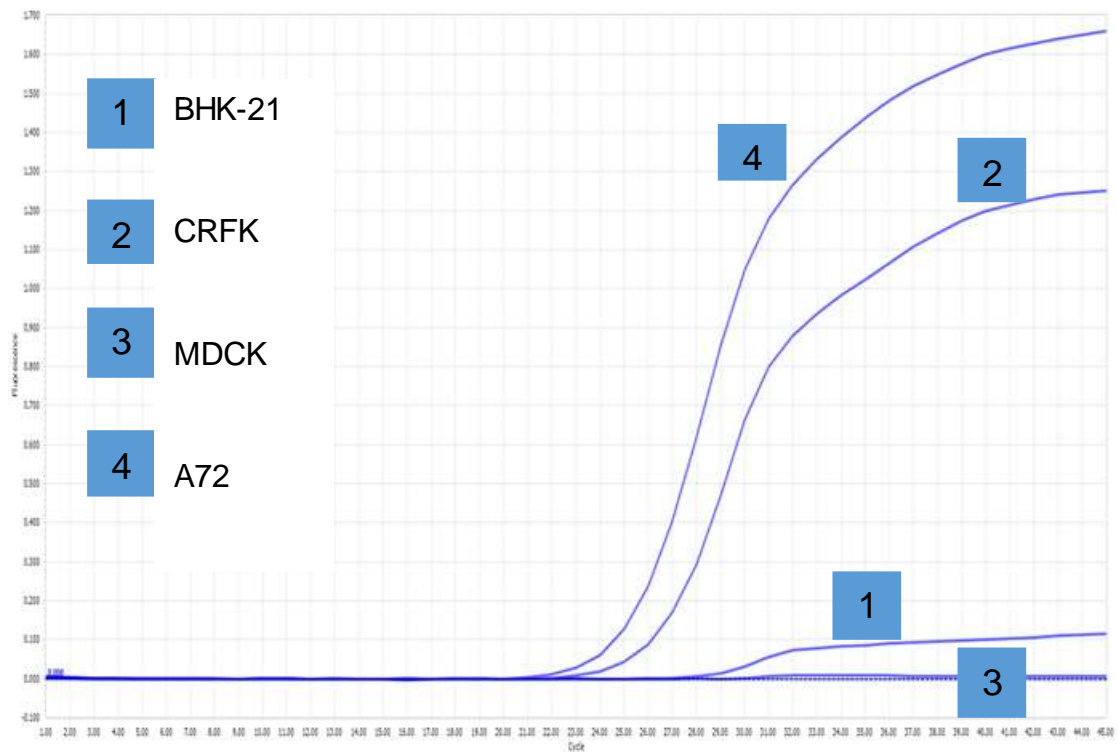


Figura 7. Gráfica de resultados de líneas celulares proporcionadas por el área de Producción de Biológicos.

Cuadro 8. Resultados de líneas celulares con 21, 23 y 39 pases proporcionadas por Producción.

Color	Nombre de la muestra	Cq	Resultado por tinte	Tinte	Resultado RT-PCR
1	MDCK-P21	26.08	Positivo	FAM	Positivo
1	MDCK-P21	-	Negativo	Red610	
2	VERO-P23	27.93	Positivo	FAM	Positivo
2	VERO-P23	-	Negativo	Red610	
3	CRFK-P39	25.5	Positivo	FAM	Positivo
3	CRFK-P39	-	Negativo	Red610	

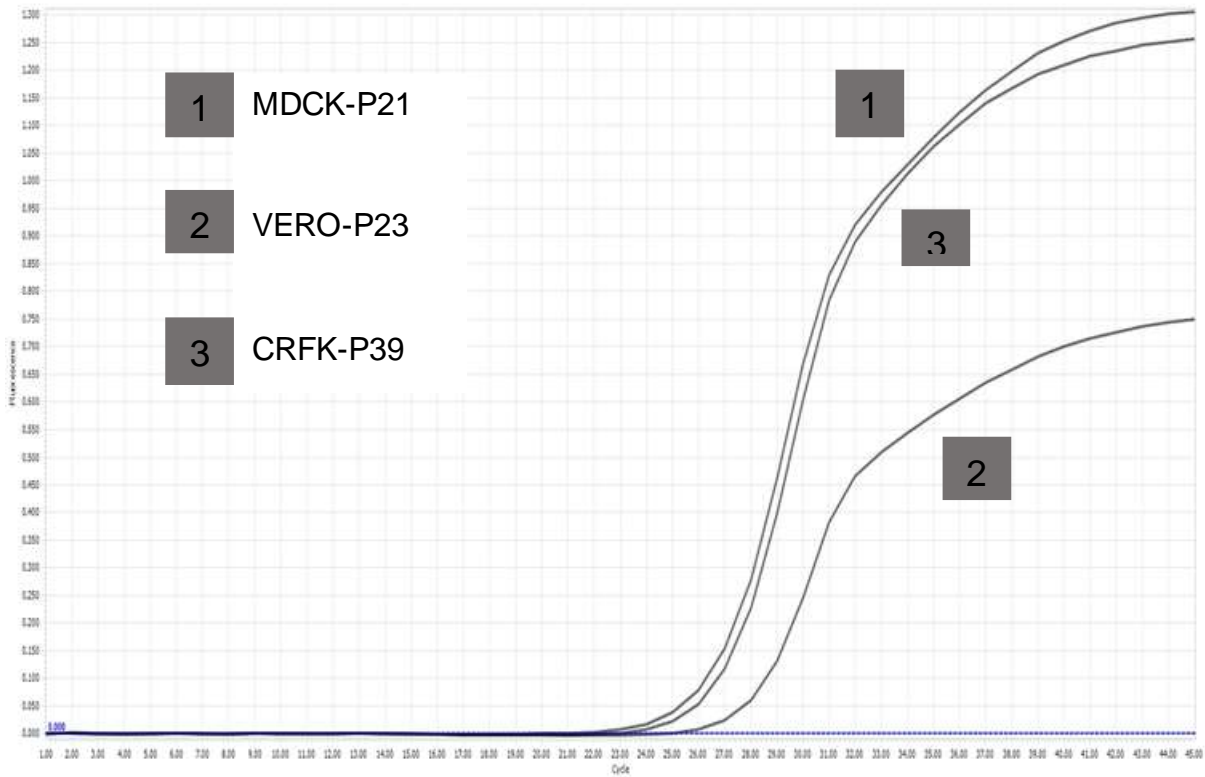


Figura 8. Gráfica de resultados de líneas celulares con 21, 23 y 39 pases proporcionadas por Producción.

En la Figura 7 se observan los resultados obtenidos de las líneas celulares que fueron otorgadas por el área de producción de Biológicos. A diferencia de la Figura 6 que muestra que todos los resultados de las líneas celulares utilizadas por Investigación y Desarrollo son positivos, en este gráfico de amplificación se aprecian resultados positivos (A-72 y CRFK) y resultados negativos (BHK-21 y MDCK).

La muestra 1, correspondiente a BHK-21, presenta una ligera amplificación. Sin embargo, esto no se marca como un resultado positivo ya que esta amplificación no supera el valor umbral y, al presentar un valor de Cq en el canal Red610, nos indica un resultado negativo en vez de una reacción inhibida (Microbial, s.f.).

Así mismo, la Figura 8 referente a las 3 muestras de líneas celulares mayores a 20 pases (MDCK-P21, VERO-P23 y CRFKP-39), cultivadas y crecidas por el departamento de Producción de Biológicos, arroja un resultado positivo a *Mycoplasma* para todos los casos. No obstante, se muestra una peculiaridad en el gráfico de amplificación de esta Figura ya que las curvas correspondientes a MDCK-P21 y CRFK-P39 muestran un alto grado de similitud, tanto en el ciclo de amplificación como en la cantidad de fluorescencia emitida, a diferencia de la línea celular VERO-P23 que amplificó un par de ciclos después y con menor emisión de fluorescencia en comparación con las otras líneas celulares presentes en este gráfico. Sin embargo, el equipo lo detecta como una muestra positiva debido a que la fluorescencia supera el umbral utilizando el canal de FAM (Ruíz-Villalba et al., 2021).

Para efectos de detección de *Mycoplasma* en cultivos celulares, utilizando la técnica de RT-PCR, no es necesario realizar una cuantificación de los resultados, por lo que esta prueba únicamente arrojará resultados cualitativos positivo o negativo.

6. CONCLUSIÓN.

El método de detección de *Mycoplasma* mediante RT-PCR, utilizando el Kit de Sartorius, fue eficiente al momento de evaluar distintas líneas celulares y el medio que se utiliza para mantenerlas.

Mediante la RT-PCR se optimizó el tiempo de detección de *Mycoplasma* en cultivo celular ya que mientras que el método tradicional proporciona resultados en 30 días, utilizando la RT-PCR junto con el Kit de detección de *Mycoplasma* este resultado se obtuvo en 3 horas, contemplando la inactivación por calor, la preparación y restitución de reactivos y el tiempo que tarda en correr el ensayo.

El canal de Red610 fue una solución viable ante la falta del canal de ROX en el termociclador Roche LightCycler 96.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, P., Tachiquín, M., Rocha, M., Pineda, B., Chánez, M. (2014). PCR EN TIEMPO REAL. Recuperado de: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. México, D.F. SEMARNAT. Pg: 175-198.

An, N., Wang, C., Dou, X., Liu, X., Wu, J., Cheng Y. (2022) Comparison of 16S rDNA Amplicon Sequencing With the Culture Method for Diagnosing Causative Pathogens in Bacterial Corneal Infections. doi: 10.1167/tvst.11.2.29. PMID: 35179557; PMCID: PMC8859490.

Armstrong, S. E., Mariano, J. A., & Lundin, D. J. (2010). The scope of Mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*, 38(2), 211–213. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2010.03.002>

Batéjat C, Grassin Q, Manuguerra JC, Leclercq I. Heat inactivation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J Biosaf Biosecur.* 2021 Jun;3(1):1-3. doi: 10.1016/j.jobb.2020.12.001. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33521591; PMCID: PMC7825878.

Baust, J. M., Buehring, G. C., Campbell, L., Elmore, E., Harbell, J. W., Nims, R. W., Price, P., Reid, Y. A., & Simione, F. (2017). Best practices in cell culture: An overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 53(8), 669–672. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>

Biosearch technologies (2021) Multiplexing recommendations for BHQ probes and Primers. (2021). https://biosearchassets.blob.core.windows.net/assets/bti_bhq_selectionchart.pdf

Brechtbuehl, K., S. A. Whalley, G. M. Dusheiko y N. A. Saunders. 2001. A rapid realtime quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. *Journal of Virological Methods* 93: 105-113.

Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2003). Mycoplasma contamination of cell cultures. *Encyclopedia of Cell Technology.* <https://doi.org/10.1002/0471250570.spi054>

Dullaert-de boer, M., Akkerman, O. W., Vermeer, M., Hess, D. L. J., Kerstjens, H. A. M., Anthony, R. M., ... van der Zanden, A. G. M. (2018). Variability and cost implications of three generations of the Roche LightCycler® 480. PLOS ONE, 13(1), e0190847. doi:10.1371/journal.pone.0190847

Favi, C., Miriam; Valenzuela W., Verónica; Roos K., Orieta. (1991). Estudio comparativo de dos métodos de diagnóstico de rabia: inoculación de ratones lactantes y cultivo de células BHK-21. Avances en Medicina Veterinaria, Vol.6(2).

Feng, L., Natarajan V., Amy S., Kiss, R., Amanullah, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production, mAb, 2:5, 466-479, DOI: 10.4161/mabs.2.5.12720

Herráez, A. (2012). Biología Molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. 2da Edición. Barcelona, España. Elsevier. Págs: 201-212.

Jaime, C., J., Mancipe, L. F., Ramírez, G., & Vera, V. (2011). Cultivos Celulares Como Alternativa para el Aislamiento y la Producción de Biológicos contra el virus de influenza. Nova, 9(15), 83. <https://doi.org/10.22490/24629448.491>

Klebe, R.J.; Grant, G.M.; Grant, A.M.; Garcia, M.A.; Giambernardi, T.A.; Taylor, G.P. (1996). *RT-PCR Without RNA Isolation*. *BioTechniques*, 21(6), 1094–1100. doi:10.2144/96216rr02

Labnet Biotecnica. (n.d.). Informacion Técnica Soluciones Rox. Retrieved November 5, 2022, from <https://www.labnet.es/content/34-informacion-tecnica-soluciones-rox>

Lutfalla, G. y G. Uze. (2006). Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments. *Methods in Enzymology* 410: 386- 400

Maniloff, J. (2002). Phylogeny and Evolution. In: Razin, S., Herrmann, R. (eds) *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/0-306-47606-1_2

Méndez-alvarez, S., Pérez-Roth, E. (2004). Multiplex PCR in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22:183-91.

Merk. (2021) Análisis de Mycoplasma en la Industria Farmacéutica <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/applications/microbiologicaltesting/mycoplasma-testing#why>

Nelson, D. L., Cox, M. M., & Hoskins, A. A. (2021). *Lehninger Principles of biochemistry.* Macmillan Learning.

NOM-036-SSA2-2012. (2012). Prevención y control de enfermedades. Aplicación de vacunas, toxoides, faboterápicos e inmunoglobulinas en el humano.

Onscience.es. (2021, April 21). Producción de Vacunas Basada en Cultivo Celular. On Science. Retrieved October 27, 2022, from <https://onscience.es/produccion-de-vacunas-basada-en-cultivo-celular/>

Philippeos, C., Hughes, R. D., Dhawan, A., & Mitry, R. R. (2011). Introduction to cell culture. *Methods in Molecular Biology*, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-367-7_1

Rivera, J., Castillo, L., Sánchez, J. (2011). Mycoplasma detection in cell cultures. *ENF INF MICROBIOL*, 2011 31 (2): 60-62

Roldán, M., Argañaraz, M., Vanesa, E., García, D., Zampini, R., Lujan, E., Vella, M., Peña, M., Oliva, E. (2019). Guía de Trabajos Prácticos. Cátedra de Biología Celular y Molecular. CONICET. p. 1-12

Rubio, J., Marwa, A., Thuy, H., Ta-Thang. (2011). Uso de PCR multiple en el diagnóstico simultáneo de parasitosis. *Biomédica. Nuevos desarrollos en el diagnóstico de parásitos.* 31(sup.3):3-315.

Ruiz-Villalba A, Ruijter JM, van den Hoff MJB. Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life (Basel).* 2021 May 29;11(6):496. doi: 10.3390/life11060496. PMID: 34072308; PMCID: PMC8229287.

Sung, J., & Hawkins, J. R. (2020). A highly sensitive internally-controlled real-time PCR assay for mycoplasma detection in cell cultures. *Biologicals*, 64, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.12.007>

TaqMan™ gene expression assay (FAM). Thermo Fisher Scientific - US. (n.d.). Retrieved November 9, 2022, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4331182>

Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The ultimate QPCR experiment: Producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>

Thornton, B., & Basu, C. (2015). Rapid and Simple Method of qPCR Primer Design. *PCR Primer Design*, 173–179. doi:10.1007/978-1-4939-2365-6_13

Valasek, M. A. y J. J. Repa. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiological Education* 29: 151-159.

Wong, M. L. y J. F. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75-85.