

Caracterización de especies de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares

Pérez Castillo, Anisleidy¹
Lobo Rivero, Evelyn²
Castellón Madruga, Evelio³

¹ Instituto de Higiene, Epidemiología y Microbiología/Microbiología Sanitaria, La Habana, Cuba, anisleidy@inhecensa.edu.cu.sld.cu

² Centro nacional de Sanidad Agropecuaria/Dpto. Bacteriología-Parasitología, Mayabeque, Cuba, elobo@censa.edu.cu

³ Centro nacional de Sanidad Agropecuaria/Dpto. Bacteriología-Parasitología, Mayabeque, Cuba, evelio@censa.edu.cu

Resumen:

La contaminación de los cultivos celulares por micoplasmas dificulta la investigación básica, el desarrollo y la producción de productos biológicos. El conocimiento de las especies más frecuentes de micoplasmas contaminantes, la resistencia antibiótica que puede manifestarse en los aislados obtenidos se presentan como interrogantes en el trabajo rutinario de MYCOLAB (Laboratorio para el Diagnóstico de Micoplasmas). El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar la contaminación por micoplasmas en cultivos celulares. Para esto se evaluaron a través de ensayos PCR especie-específicos muestras de cultivos celulares previamente caracterizadas. Para el estudio de la resistencia a los aislados obtenidos; se les realizó la prueba de la mínima concentración inhibitoria (CMI, por sus siglas en inglés) con diversos antibióticos reportados para la eliminación de los micoplasmas. El resultado de la identificación de las especies, arrojó que *Mycoplasma orale* resultó ser la especie de mayor representatividad con un 37,9 %, seguido de *Mycoplasma fermentans* (31%), *Acholeplasma laidlawii* (27,5%), *Mycoplasma arginini* (25,8%), *Mycoplasma hyorhinis* (20.6%) y *Mycoplasma salivarium* (6,8%). El estudio de resistencia antimicrobiana mostró que los aminoglucósidos, exhibieron las CMIs más elevadas, lo cual evidencia la presencia de cepas resistentes a estos fármacos. Se concluye que *Mycoplasma orale* y *Mycoplasma fermentans* fueron las especies más frecuentes de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares y que los aislados cubanos, presentan una marcada resistencia antimicrobiana a los aminoglucósidos. A partir de estos resultados el Laboratorio de MYCOLAB mejora su sistema de calidad y el servicio que se le brinda a la industria biofarmacéutica del país.

Palabras clave: PCR, sistema de calidad, resistencia antimicrobiana.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo celular juega un papel importante en la biotecnología moderna y en el desarrollo de numerosos proyectos de investigación. La contaminación de estos cultivos por hongos y bacterias es frecuente y tratable; sin embargo, se produce una contaminación grave y no fácilmente detectable por micoplasmas (1).

Estos microorganismos se aislaron por primera vez de un cultivo celular, en 1956 por Robinson y Wichelhausen (2). Desde entonces y hasta la fecha, alrededor de 20 especies se describen como contaminantes en los cultivos celulares, donde *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma orale* y *Acholeplasma laidlawii* se identifican como causantes del 95 % de las contaminaciones. La incidencia de contaminación a nivel mundial de los cultivos celulares para una especie se encuentra entre 15 y 80 %; mientras que la coinfección puede encontrarse hasta en 60 % (3).

Se conoce que las especies *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans* y *Mycoplasma hominis* se hallan comúnmente en el tracto orofaríngeo de los humanos, lo cual supone que el personal de laboratorio constituye una de las fuentes de contaminación de los cultivos celulares con micoplasmas. Por otra parte, *Mycoplasma arginini* y *Acholeplasma laidlawii* son frecuentemente identificadas en el suero bovino y *Mycoplasma hyorhinis* es un patógeno frecuente de cerdos, de ahí que, tanto el suero bovino como el porcino que se utilizan para la elaboración de los medios de cultivo, pueden ser también una fuente posible de contaminación (4).

Otras fuentes de contaminación se relacionan con los animales de laboratorio (Ferreira y cols., 2008), con embriones de pollos (5), y con los tejidos que se utilizan para la elaboración de cultivos primarios; de igual manera, las líneas celulares ya contaminadas pueden propagar la contaminación de micoplasmas (3).

Numerosos métodos se emplean para lograr el aislamiento, la detección y la identificación de los micoplasmas dentro de los que se encuentran: el cultivo microbiológico, pruebas bioquímicas y enzimáticas, tinción fluorescente del ácido desoxirribonucleico (ADN), las técnicas moleculares como la Hibridación de ácidos nucleicos (HAN) (6) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés). Este último se considera como un método robusto, eficaz y fiable en la detección de micoplasmas (7).

Aunque la PCR es una poderosa herramienta para la amplificación de secuencias genéticas, sin embargo no siempre la utilización de un protocolo de PCR establecido y optimizado, arroja el mismo resultado en otro laboratorio. Por lo que un paso muy importante en el desarrollo de la técnica es la optimización de la PCR, porque reduce la amplificación de productos no específicos. (8).

Una práctica común en los laboratorios es el uso de antibióticos en los cultivos celulares para evitar la contaminación microbiana. Las consecuencias del uso excesivo de antibióticos es que, por una parte se enmascara una técnica aséptica deficiente y por otra puede llevar a que aparezca, en los microorganismos, el fenómeno llamado Resistencia antibiótica (9).

Debido a la ausencia de pared celular, los micoplasmas son resistentes intrínsecos a numerosos antibióticos que actúan sobre esta diana, como es el caso de la penicilina, cefalosporina y rifamicina (10). Estudios realizados por Ryan y Mariano (2011) demuestran los altos porcentajes de resistencias a antibióticos en aislados de micoplasmas procedentes de cultivos celulares. Según Taylor-Robinson y Bébear (1997), el patrón de sensibilidad a los antibióticos se debe, en gran medida, a la fuente de donde provienen estos microorganismos.

En Cuba, la detección de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares, sueros y productos biofarmacéuticos se lleva a cabo en el Laboratorio de Referencia de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el Diagnóstico de Micoplasmas (MYCOLAB), del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Este laboratorio, desde 1992 brinda servicios de diagnóstico de micoplasmas como parte de los sistemas de calidad para la fabricación y liberación de productos biotecnológicos. MYCOLAB basa su algoritmo diagnóstico, principalmente, en métodos de cultivo microbiológico y PCR, que indican la presencia o ausencia de micoplasmas en la muestra. Estas pruebas se llevan a cabo según lo dispuesto por diversas agencias reguladoras (11).

En estudios previos realizados por Hernández y cols., (2006), en MYCOLAB, se identificaron cuatro especies de micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares mediante la utilización de pruebas bioquímicas, donde *Mycoplasma arginini* fue el de mayor incidencia. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, para definir la especie de micoplasmas por este método, el trabajo se hace laborioso, requiere de más tiempo y puede traer errores en la interpretación del resultado. Por lo antes expuesto, se hace necesario implementar un método que reduzca el tiempo del resultado, sea específico e incluya la identificación de especies de micoplasmas contaminantes. Este último aspecto da la posibilidad al cliente de identificar la probable fuente de contaminación.

De igual manera no existen estudios previos, realizados en MYCOLAB, sobre la resistencia antibiótica en aislados de micoplasmas contaminantes. Disponer de este conocimiento reviste especial importancia para trazar estrategias en el control de las contaminaciones por micoplasmas en cultivos celulares y productos biológicos, Por todo lo antes expuesto el objetivo de este trabajo es caracterizar la contaminación por micoplasmas en cultivos celulares teniendo en cuenta las especies más frecuentes de micoplasmas contaminantes que se encuentran circulando en la industria biotecnológica cubana, sus características en cuanto a la resistencia antimicrobiana.

II. MÉTODO

A. Cepas de micoplasmas utilizadas

En el estudio se empleó cepas de referencia de la “Colección de Cultivos Tipo Americana” (ATCC, siglas en inglés) de *Mycoplasma orale* (ATCC 15544), *Mycoplasma fermentans* (ATCC 19989), *Mycoplasma salivarium* (ATCC 23064), de la Colección de Cultivos Tipo Inglaterra (NCTC, siglas en inglés) *Mycoplasma arginini* (NCTC 10129)¹, *Mycoplasma hyorhinis* (NCTC 10130) y de la Farmaco-

pea Europea (Ph Eur, siglas en inglés) *Acholeplasma laidlawii*, pertenecientes todas a la colección de cepas de MYCOLAB–CENSA.

B. Muestras.

Se estudiaron un total de 144 cultivos celulares, procedentes de seis laboratorios pertenecientes a la provincia La Habana, Cuba, las cuales llegan a MYCOLAB, CENSA, para el diagnóstico de estas entidades como parte de los sistemas de calidad establecidos durante la fabricación y liberación de productos biotecnológicos y del sistema de gestión de la calidad de la industria farmacéutica cubana.

C. Cultivo.

Cada muestra fue inoculada en medio Hayflick líquido y sólido. Los cultivos fueron incubados por 15 días a 37 °C bajo condiciones de microaerofilia (12). El microorganismo fue presuntivamente identificado mediante el examen visual; basado en los cambios de color y pH en los tubos y el crecimiento de colonias típicas de micoplasmas en las placas.

D. Cebadores empleados.

M. orale S: TGA TCA TTA GTC GGT GGA AAA CTA; AS: TAT CTC TAG AGT CCT CGA CAT GAC TC; 325bp

M. hyorhinis S: GTA GTC AAG CAA GAG GAT GT; AS: GCT GGA GTT ATT ATA CCA GGA, 346bp

M. fermentans S: TGA TCA TTA GCT GAT GGG GAA CT; AS: TCT CTT AGA GTC CTC AAC TAA ATG, 324bp

A. laidlawii S: GAT GAG AAC TAA GTG TTG GCC ATA A; AS: CGC TAG AGT CCC CAA CTT AAT GA; 300bp

M. salivarium S: ATGGATTGTAAAGTGCTGTTGCTAG; AS: GCGTCAACAGTTCTCTGCCG, 434bp

E. Reacción en Cadena de la Polimerasa

La técnica usada fue descrita por por Kazemiha y cols., 2009 (13). El ADN fue extraído apartir de 1 ml de los cultivos celulares y los cultivos de las cepas de referencia utilizando el método de choque térmico. (14)

La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 µL, que contiene Solución tapón II al 1X (Promega), 200 µM de cada dNTPs (Promega); 15 pmoles de cada cebador, 1.5 mM de MgCl₂, 1 U de Taq polimerasa (Amplicon, CENSA) y 3 µL de muestra de ADN de cepa de referencia. Se empleó agua libre de nucleasas como control negativo de la reacción.

La reacción de PCR se desarrolló en un Termociclador eppendorf Mastercycler Gradient, 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 32 ciclos de desnaturalización a 94°C por 60 segundos, hibridación a 60°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos, seguidos de un ciclo de extensión final de 72°C por 5 minutos. La corrida y la visualización se realizaron en gel de agarosa (Sigma) al 1 % con buffer TBE 0.5X teñido con bromuro de etidio con 0.5 µg/mL.

Los controles positivos (ADN de cada cepa de referencia) y el control negativo (agua ultrapura) los cuales fueron adicionados en todas las amplificaciones.

F. Evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana

Para la evaluación de este parámetro se utilizaron los antibióticos: ciprofloxacina, kanamicina, tilosina, oxitetraciclina, enrofloxacin, gentamicina estreptomicina, minociclina y neomicina. La resistencia antimicrobiana a 11 cepas de micoplasmas aisladas se determinó por el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y se usó el medio Hayflick líquido. La CMI se definió como la menor concentración de antibiótico que inhibió el crecimiento del microorganismo y en la cual no ocurrió cambio de coloración de rojo a amarillo o rojo a fresa intenso, según Hannan 2000 (15).

III. RESULTADOS

Las 144 muestras de este estudio se testaron previamente por Agar sangre, cultivo microbiológico para micoplasmas y PCR-CI para *Mollicutes*. El comportamiento de las muestras tanto para el cultivo de micoplasmas como para el PCR-CI arrojó que en 86 muestras no se detectó la presencia de micoplasmas, tanto por cultivo microbiológico como por PCR-CI; en 11 se evidenció la presencia de micoplasmas por ambos ensayos y en 47 solamente se detectó por PCR-CI. Los resultados de la siembra en Agar sangre no se muestran, ya que no forman parte de este estudio.

El 40,3 % de las muestras resultó positivas a micoplasmas, lo cual coincide con lo reportado por Sobarzo y cols., (2006) quienes detectaron la presencia de micoplasmas en el 46,2% de sus líneas cultivos celulares (16). Este resultado puede vincularse con que la presencia de micoplasmas como contaminantes de cultivos celulares es un problema frecuente en los laboratorios que efectúan tales cultivos, estimándose que entre el 15-80% de los mismos están contaminados con estos microorganismos (17).

La contaminación de los productos biológicos con micoplasmas normalmente invalida los resultados de la investigación biomédica. Puede ser que los cultivos celulares no mueran, pero su actividad y funciones permanecen de manera alterada por lo que resultan inadecuados para la experimentación (18).

A las 58 muestras de cultivos celulares (40,3 %) donde se detectó la presencia de *Mollicutes* se les realizó los diferentes PCR para identificar las especies contaminantes. La Tabla 5, muestra la relación de las matrices y la identificación de las especies de micoplasmas.

Los PCR que se utilizaron permitieron identificar especies de micoplasmas en 56/58 (96.5 %) de las muestras que resultaron positivas a *Mollicutes*. En caso de dos cultivos no fue posible identificar la especie de micoplasmas que se encuentra presente como contaminante. Este resultado coincide con lo que reporta Nikfarjam y Farzaneh (2012), quienes señalan, en el 1.2 % de las muestras investigadas, la presencia de *Mollicutes* como contaminantes sin que pudieran identificar la especie (4)

Una posible explicación a este resultado es la presencia, en estos cultivos celulares, de alguno de los siguientes *Mollicutes*: *Mycoplasma homini*; *Mycoplasma pirum*; *Mycoplasma bovis* o *Acholeplasma vituli*, agentes que provienen de diferentes fuentes de infección y que también se reconocen como potenciales contaminantes de los cultivos celulares (19). Para estas especies se cuenta, en la actualidad, con ensayos de PCR que permitan su identificación; por lo tanto, es un punto de partida para futuros trabajos de investigación dentro del sistema de mejora continua de MYCOLAB.

Los cultivos celulares contaminados por micoplasmas representan un hábitat artificial para estos microorganismos. Estudios en varios países demuestran que entre 10% a 80% de los cultivos celulares

pueden quedar infectados por estos agentes (13). La presencia de una especie o la coinfección con otros agentes también se reporta como un proceso donde los porcentajes dependen de varios factores (17)

Como resultado general, en el 58.6 % (34/58) de los cultivos celulares se detectó la infección de una sola especie, el 24.1 % (14/58) presentó coinfección con dos especies; en el 12 % (7/58) se detectó la infección de tres especies de micoplasmas y solamente en el 1.7 % (1/58) se evidenció infección múltiple al estar presente cuatro especies coinfectando el cultivo.

Luego del proceso de aislamiento se contó con 11 aislados cubanos. El resultado de la identificación de los aislados, con la utilización de los PCR mostró que las especies identificadas se corresponden con *Mycoplasma orale*; *Mycoplasma hyorhinis*; *Mycoplasma arginini*; *Mycoplasma fermentans* y *Acholeplasma laidlawii*.

Mycoplasma orale resultó la especie de mayor representatividad dentro de los aislados. Este resultado está en correspondencia con los porcentajes que refiere Lobo y cols., (2016) (6). La variación en el porcentaje de cada especie puede deberse a varios factores, entre los que se encuentra el tamaño de la muestra, los métodos que se emplean en el diagnóstico, así como los materiales que se utilizan y normas de calidad que se cumplen durante la producción de los biológicos .

En el estudio de la susceptibilidad in vitro de los 11 aislados de micoplasmas procedentes de cultivos celulares frente a nueve agentes antimicrobianos.

Tres agentes de los antimicrobianos mostraron buena actividad frente a los aislados de micoplasmas, tal es el caso de la minociclina (rango de CMI: 0.25-0.5 µg/mL); tilosina (rango de CMI: 0.25 a 1 µg/mL) y oxitetraciclina (rango de CMI: 1 a 2 µg/mL). Estos resultados coinciden con lo reportado por el Comité de expertos sobre medicamentos para usos veterinarios, quienes recomienda el uso de macrólidos (tilosina); tetraciclinas (oxitetraciclinas y minociclina) y quinolonas como antimicrobianos para la eliminación de contaminaciones por micoplasmas.

Por su parte, las quinolonas son de origen sintético y constituyen uno de los grupos de antimicrobianos que más se utilizan por su eficacia frente a los micoplasmas (20). Su mecanismo de acción interfiere con la replicación del ADN por actuar sobre las topoisomerasas bacterianas, lo cual lleva a la muerte celular (21). En micoplasmas, solamente se describen las mutaciones en las topoisomerasas y los sistemas de eflujo como los responsables de la disminución de la susceptibilidad a estos fármacos (22).

En este caso, tanto la enrofloxacin como la ciprofloxacina (pertenecientes al grupo de las quinolonas) mostraron valores hasta 8 µg/mL. Estas CMIs están ligeramente por encima del rango 0.125 a 4 µg/mL que refieren Prasad y LimFong, (2002) (23).

La disminución de la susceptibilidad a las quinolonas puede estar dada por el gran uso que tienen estos fármacos en los últimos años; esto implica una gran presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas lo cual origina cepas resistentes. Otro aspecto a tener en cuenta en este resultado, como explicación a los mecanismos de resistencia a las quinolonas, se corresponde con los sistemas de expulsión activa (22), los cuales son responsables de bajos niveles de resistencia y pueden actuar como un primer paso en el comportamiento de cepas altamente resistentes.

En otro sentido, las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro y se utilizan para ampliar la acción y dar sinergia a micoplasmicidas de mayor especificidad; debido al gran uso de estos antimicrobianos se describe, a nivel internacional, una alta resistencia surgida como consecuencia de la adquisición de genes tet (tetraciclina) y/o genes otr (oxitetraciclina) por parte de las bacterias, tanto comensales como patógenas (24).

En este caso, los valores de la CMI para la oxitetraciclina (1-2 µg/mL) y la minociclina (0.25-0.5 µg/mL) demuestran que poseen un buen efecto in vitro sobre las cepas en estudio. Estos resultados están en relación con los que obtuvo Ogawa y cols., (2013), quienes señalan valores de CIM entre 0.016–2 µg/mL (24)

En el presente estudio los agentes antimicrobianos, pertenecientes al grupo de los aminoglucósidos, exhibieron las siguientes CMIs: neomicina (rango de 8 a 16 µg/mL), kanamicina (rango de 4 a 32 µg/mL), gentamicina (rango de 8 a 32 µg/mL), estreptomina (>64 µg/mL). Como se puede apreciar, los resultados de la CMI son elevados, lo cual evidencia la presencia de cepas resistentes a estos fármacos. Estos resultados coinciden con lo que describió Perlman y cols., 1967 quienes obtuvieron 36 cepas de micoplasmas con resistencia múltiple a los aminoglucósidos empleados en su estudio. Este resultado en los cultivos celulares puede ser debido a la exposición a estreptomina y otros aminoglucósidos durante los intentos de eliminar las infecciones bacterianas de los cultivos de células (25).

IV. CONCLUSIONES

- Mycoplasma orale y Mycoplasma fermentans se identificaron como las especies más frecuentes de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares.
- Los aislados cubanos, de micoplasmas contaminantes en cultivos celulares, presentan una marcada resistencia antimicrobiana a los aminoglucósidos.

REFERENCIAS

1. **Fader, C. M.**, Medero, A., Furlán, M. y Colombo, M. I. (2009). Observación de Mycoplasma sp. Por M.E., tratamiento, eliminación y confirmación por PCR anidada. Congreso; 10th Inter-American Congress on Electron Microscopy (CIASSEM 2009).
2. **Chernov, V. M.**, Chernova, O. A., Sanchez-Vega, J. T., Kolpakov, A. I., y Ilinskaya, O. N. (2014). Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: Vesicular Traffic in Bacteria and Control over Infectious Agents. *Acta Naturae*, 6(3), 41-51.
3. **Rottem, S.**, y Kahane, I. (2012). Mycoplasma Cell Membranes: *Springer US*. Volumen 20, Chapter 1 Mycoplasma Membranes as Models in Membrane Research, 1-22.
4. **Nikfarjam, L.** y Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell Journal*, 13(4), 203-212.
5. **Selwyn, A.**, Wilson, D., Volokhov, D. V., Zhiping, Y. y Chizhikov, V. (2010). Evaluation of Mycoplasma Inactivation during Production of Biologics: EggBased Viral Vaccines as a Model. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9), 2718–2728.
6. **Lobo E.**, Pérez A., Duque A., Burgher Y., Miranda L., Timenetsky J. (2016). Prevalence of *Mollicutes* in Cell Cultures: experience in Cuba. *Rev. Salud Anim.*, 38 (2), 100-104.
7. **Asarnow, D.**, Warford, A., Fernandez, L., Hom, J., Sandhu, G., Candichoy, Z. y Rarich, R. (2010). Validation and international regulatory experience for a mycoplasma touchdown PCR assay. *[Validation Studies]. Biologicals*, 38(2), 224-231.
8. **Guevara, P.** (2004). Identificación y Diagnóstico Molecular de Microorganismos. En: Manual de laboratorio. Proyecto Iniciativa Científica del Milenio. *Red de Innovación Tecnológica IDMM editores*. Venezuela, 1-102.

9. **Coecke, S.**, Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., y Stokes, W. (2005): Guidance on good cell culture practice. A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*, 33(3), 261-287.
10. **Gaurivaud, P.**, Laigret, F., y Bove, J. M. (1996). Insusceptibility of members of the class Mollicutes to rifampin: studies of the *Spiroplasma citri* RNA polymerase beta-subunit gene. [Comparative Study]. *Anti-microb Agents Chemother*, 40(4), 858-862.
11. **Lozada, Y.** (2012). Tesis presentada en opción al grado de Máster en Microbiología Veterinaria: Detección confiable de micoplasmas en productos biofarmacéuticos de aplicación biomédica. Mayabeque, Cuba.
12. **Farmacopea Europea 8.0.** (2014). Methods of analysis. Mycoplasmas. Appendix 2.6.7.
13. **Kazemiha V. M.**, Shokrgozar, M. A., Arabestani, M. R., Moghadam, M. S., Azari, S., Maleki, S., Amanzadeh, A., Tehrani, M. J y Shokri, F. (2009). PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology*, 61(3), 117-124.
14. **Timenetsky, J.**, Santos, L. M., Buzinhani, M. y Mettifofo, E. (2006). Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Braz J Med Biol Res*. 39(7), 907-14.
15. **Hannan, P. C.** (2000). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary Mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. *Veterinary Research*, 31, 373-395.
16. Sobarzo Gustavo, María Angélica Martínez Tagle, Roberto Vidal Alvarez, María Cristina Martínez Torrens, Luis Fidel Avendaño Carvajal. (2006). Detección de contaminación por Mollicutes en cultivos celulares mediante amplificación del gen 16S rARN. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2006; 40 (4): 515-20.
17. **Uphoff, C.C.** y Drexler, H.G. (2011). Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics. *Methods Mol Biol*, 731, 105-14.
18. **Drexler, H. G.**, Uphoff, C. C., Dirks, W. G., y MacLeod, R. A. (2002). Mix-ups and mycoplasma: the enemies within. *Leuk Res*, 26(4), 329-333.
19. **Invivogen.** (2005). Mycoplasma: The Insidious Invader of Cell Cultures. <http://www.invivogen.com/docs/Insight200511.pdf>
20. **Van Bambeke, F.**, Michot, J.M., Van Eldere, J. y Tulkens, P.M. (2005) Quinolones in 2005: an update. *Clin. Microbiol. Infect.* 11(4), 256-80.
21. **Duque, A.**, Pérez, A., Espinosa, I. y Lobo, E. (2016). Susceptibilidad antimicrobiana de aislados cubanos de *Mycoplasma gallisepticum*. *Revista Salud Animal* (En proceso de edición). Artículo 132/2017.
22. **Tiago A.** (2007). Mecanismos de resistencia a las quinolonas en *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España.
23. **Prasad, E.** y Lim-Fong, R. (2002). Mycoplasma detection and elimination. En: Abstract Book of 14th International Congress of the International Organization of Mycoplasmaology (IOM). July 7-12, Viena, Austria. 84.
24. **Ogawa, M.**, Uchiyama, T., Satoh, M., y Ando, S. (2013): Decontamination of mycoplasma-contaminated *Orientia tsutsugamushi* strains by repeating passages through cell cultures with antibiotics. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *BMC Microbiol*, 13, 32.
25. **Perlman, D.**, Rahman, S. B., y Semar, J. B. (1967). Antibiotic control of Mycoplasma in tissue culture. *Appl Microbiol*, 15(1), 82-85.