

Methodensammlung der Bund/ Länder-Arbeitsgemeinschaft Gentechnik	
Nachweis von Mykoplasmen in Zellkulturen mittels PCR	AM029
Erstellt vom Unterausschuss Methodenentwicklung der LAG, September 2011	
Status: verabschiedet	

1 Zweck und Anwendungsbereich

Im Rahmen der Überwachung von gentechnischen Arbeiten und Anlagen gemäß GenTG ist u. a. zu prüfen, ob Zellkulturen, mit denen gentechnisch gearbeitet wird, Organismen höherer Risikogruppen enthalten und abgeben können.

Mykoplasmen sind sehr kleine (< 0,2 µm Ø) parasitierende Bakterien der Klasse Mollicutes; inzwischen sind mehr als 100 *Mycoplasma*-Arten bekannt. Einige Arten können bei Menschen und Tieren Krankheiten hervorrufen und wurden deshalb der Risikogruppe 2 zugeordnet [1]. Durch die chronische Infektion mit Mykoplasmen können außerdem Funktionstüchtigkeit, Stoffwechsel und Wachstum sowie immunologische und biochemische Eigenschaften der im Labor verwendeten tierischen und humanen Zellkulturen beeinträchtigt werden.

Laut Uphoff et al. [2] sind etwa 15 bis 35% aller tierischen und humanen Zellkulturen mit Mykoplasmen kontaminiert. Ein Großteil der in diesem Zusammenhang untersuchten Kulturen (ca. 47%) war mit *Mycoplasma fermentans* infiziert, gefolgt von *Mycoplasma hyorhinis* (19%), *Mycoplasma orale* (10%), *Mycoplasma arginini* (9%), *Acholeplasma laidlawii* (6%) und *Mycoplasma hominis* (3%).

Mycoplasma bovis wurde nur selten nachgewiesen. *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium* und *Mycoplasma synoviae* können ebenfalls auftreten.

Alle genannten Arten gehören zur Risikogruppe 2, außer *Mycoplasma orale* (Risikogruppe 1) [1].

Die hier beschriebene PCR-Methode wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien (DSMZ) entwickelt und basiert auf der spezifischen Amplifikation eines DNA-Abschnittes des *Mycoplasma*-16S rRNA-Gens. Damit können Zellkulturen auf die Anwesenheit der genannten Mykoplasmenarten und auf *Acholeplasma laidlawii* hin untersucht werden [3].

2 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren, Band VI – Gentechnik aufgeführten Begriffe und Definitionen [4].

3 Kurzbeschreibung

Aus Zellkulturen oder deren Überständen wird die Gesamt-DNA extrahiert. Mittels PCR wird darin enthaltene *Mycoplasma*- und/oder *Acholeplasma laidlawii*-DNA qualitativ nachgewiesen.

Durch das Mitführen einer internen PCR-Kontrolle kann im jeweiligen PCR-Ansatz eine mögliche PCR-Inhibition festgestellt werden.

Zur Spezifizierung der nachgewiesenen Mykoplasmen-DNA schließt sich eine Restriktionsanalyse oder eine Sequenzierung des PCR-Produkts an.

4 Reagenzien

Es sind nur für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.

- **H₂O**
- **PBS** (phosphate-buffered saline); pH 7,2:
 - 140 mmol/l NaCl
 - 2,7 mmol/l KCl
 - 7,2 mmol/l Na₂HPO₄
 - 14,7 mmol/l KH₂PO₄
- **1 x Trypsin-EDTA-Lösung** (z.B. 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS-Lösung, pH 7,2)
- **Zellkulturmedium** [z.B. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)]
- **DNA-Extraktions- und Aufreinigungs-System**
- **Desoxy-Nukleotid-Triphosphat-Mix (dNTP)**: je 5 mmol/l dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- **Hot-Start Taq Polymerase** (5 units/μl) mit passendem **10 x PCR-Puffer**
- **MgCl₂-Lösung**; 15 mmol/l (wenn *nicht* bereits im PCR-Puffer enthalten)
- **Oligonukleotide** (Zielsequenz: Mykoplasmen-16S rRNA Gen [2]; siehe Tabelle 1)

Tabelle 1: Oligonukleotide

Name	DNA-Sequenz des Oligonukleotids	Konzentration im Primermix
5' Primer	5'-cgc ctg agt agt acg ttc gc-3' 5'-cgc ctg agt agt acg tac gc-3' 5'-tgc ctg ggt agt aca ttc gc-3' 5'-tgc ctg agt agt aca ttc gc-3' 5'-cgc ctg agt agt atg ctc gc-3' 5'-cac ctg agt agt atg ctc gc-3' 5'-cgc ctg ggt agt aca ttc gc-3'	je 5 μmol/l
3' Primer	5'-gcg gtg tgt aca aga ccc ga-3' 5'-gcg gtg tgt aca aaa ccc ga-3' 5'-gcg gtg tgt aca aac ccc ga-3'	je 5 μmol/l

- **Primermixe** (gebrauchsfertig):
 - 5' Primer-Mix** bzw. **3' Primer-Mix** mit je 5 μmol/l der entsprechenden Primer (siehe Tab.1)
- **Positivkontrollen** (z. B. genomische *Mycoplasma*-DNAs; siehe 9.3)
- **Interne Kontrolle** (z. B. Kontroll-Plasmid-DNA; siehe 9.3)
- Chemikalien für die **Gelelektrophorese** (Agarose, Elektrophorese-Puffer, DNA-Marker etc.)
- **Restriktionsenzyme** (mit Puffer): **Hpa II**, **Xba I**, **Asp I** (Isoschizomere: *Psy I*; *Tth111 I*) und **Hae III** (Isoschizomer: *BsuRI*) oder **Sequenzierchemikalien**

5 Geräte und Hilfsmittel

Es sind nur für die Molekularbiologie geeignete Geräte und Verbrauchsmaterialien zu verwenden.

- Mikroliter-Zentrifuge
- Thermoblock für Mikrolitergefäße
- Mikroliter-Kolbenhubpipetten, verschiedene Volumina
- aerosolgeschützte Einweg-Pipettenspitzen, verschiedene Volumina
- 5 ml Schraubdeckelgefäße
- 1,5 ml und 2,0 ml-Reaktionsgefäße
- 0,2 ml PCR-Gefäße
- Thermocycler-Gerät mit Heizdeckel
- Gelelektrophorese und Geldokumentationssystem
- ggf. DNA-Sequenzierer

6 Probenahme

Die zu beprobenden Zelllinien sollten in einer kleinen Zellkulturflasche (25 cm²) ausgesät sein und am Tag der Probenahme möglichst zu ca. 60-80% konfluent gewachsen sein. Die Flasche sollte vor dem Transport mit Medium aufgefüllt und der Deckel mit Parafilm fest verschlossen werden.

Soll die Zelllinie weiter kultiviert werden, so ist sie zu passagieren und neu auszusäen. Beim Passagieren wird nur ein Teil der abgelösten Zellen wieder ausgesät (1/5 bei 90% konfluenten Linien). Die aus der Passage übrig bleibenden Zellen werden als Zellpellet eingefroren.

Von den Zelllinien, die zum Zeitpunkt des Probeneingangs noch zu dünn gewachsen sind, wird das Medium bis auf 15 ml abgenommen und aufbewahrt. Die Zellen werden bis zum Erreichen von 80-90% Konfluenz inkubiert und dann weiter verarbeitet.

Für die Probenahme aus laufenden Zellkulturen ist es zweckmäßig, Zellkulturüberstände während der Zellkulturpassage zu beproben. Um genügend Rückstellmaterial zur Verfügung zu haben, sind mindestens 3 ml Überstand pro Zellkultur zu entnehmen. Die Überstände sind kurzzeitig (1-2 Tage) bei Raumtemperatur stabil, sollten aber über längere Zeit gekühlt (mindestens bei 4°C) aufbewahrt werden.

Es können auch tiefgefrorene Zellen im Cryoröhrchen als Proben genommen werden, der Transport erfolgt dann in Trockeneis.

7 Durchführung

7.1 Allgemeines

Alle Arbeiten sind in einem S2-Labor und, soweit möglich, unter der Sicherheitswerkbank durchzuführen. Bei Arbeiten mit Zellkulturen sind besonders hohe Anforderungen an die Sterilität zu berücksichtigen.

Für die Durchführung der DNA-Extraktion und der PCR gelten die allgemeinen Hinweise und Anforderungen aus der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren, Band VI – Gentechnik; G 00.00-4 [5] und G 00.00-5 [6].

7.2 Probenvorbereitung

Aus Zellkulturüberständen:

- 1 ml Zellkulturüberstand wird bei 15.000 x g für 6 Minuten abzentrifugiert.
- Das Zellpellet wird zweimal mit je 1 ml 1 x PBS-Puffer gewaschen und jeweils 6 Minuten bei 15.000 x g abzentrifugiert.
- Das gewaschene Zellpellet wird in 200 µl PBS resuspendiert.
- Die Suspension wird 15 Minuten bei 95°C inkubiert (Inaktivierung) und vollständig für die DNA-Extraktion eingesetzt.

Gewinnung von Zellpellets aus Zellkulturen:

- Die 80-90% konfluenten Zellen werden zweimal mit 1 x PBS Puffer gewaschen. Bei adhärennten Zellen wird PBS auf die nicht bewachsene Wand der Zellkulturflasche pipettiert, die Flasche kurz geschwenkt und der Überstand abpipettiert oder abgesaugt. Bei Suspensionszellen wird jeweils das Zellpellet nach Zentrifugation gewaschen.
- Die gewaschenen Zellen werden bei 200 x g für 5 Minuten abzentrifugiert.
Anmerkung: Adhärennte Zellen müssen vor dem Zentrifugieren etwa 5 Minuten mit 1ml 1 x Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst werden. Zur Inaktivierung des Trypsins werden die abgelösten Zellen mit 5 ml Kulturmedium versetzt und vorsichtig mit einer serologischen Pipette resuspendiert.
- Das Zellpellet wird in 1,8 ml PBS suspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 15000 x g für 3 Minuten abzentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird in 400 µl PBS aufgenommen.
- Die Suspension kann zur Inaktivierung für 15 Minuten bei 95°C inkubiert werden.
- Für die DNA-Extraktion werden 200 µl eingesetzt.

7.3 DNA-Extraktion

Zur Extraktion von DNA aus Zellkulturen für die PCR-Analyse eignen sich kommerziell erhältliche DNA Extraktionssysteme.

Auch mittels herkömmlicher Extraktionsverfahren kann geeignete DNA aus Zellen extrahiert werden [7, 8].

7.4 PCR

Es wird empfohlen, mit jeder Proben-DNA jeweils einen PCR-Ansatz *ohne* und einen PCR-Ansatz *mit* interner Kontroll-DNA durchzuführen.

Die PCR *ohne* Zusatz der internen Kontrolle muss immer durchgeführt werden. Sie ist ggf. auch Voraussetzung für eine Speziesidentifizierung anhand des PCR-Produkts (siehe 7.5).

Der Zusatz von interner Kontroll-DNA zum PCR-Ansatz dient der Inhibitionskontrolle. Wird sie, wie empfohlen, stark verdünnt eingesetzt (siehe 9.3), dient sie gleichzeitig als Sensitivitätskontrolle für den PCR-Nachweis. Da es sich hierbei um eine zumindest teilweise kompetitive PCR handelt, werden Mykoplasmengehalte an der Nachweisgrenze in Anwesenheit der internen Kontrolle im Allgemeinen *nicht* detektiert. Demgegenüber kann bei hohem *Mycoplasma*-Gehalt in der Probe auch die interne Kontrolle zugunsten des *Mycoplasma*-PCR-Produktes unterdrückt werden.

Andere PCR-Amplifikationskontrollen können genutzt werden, sofern gezeigt wird, dass sie mindestens genauso gut geeignet sind.

7.4.1 Reaktionsansatz

Die Verfahrensbeschreibung gilt für Reaktionen mit einem Gesamtvolumen von 25 µl je PCR-Ansatz. Für alle Ansätze ist vorab ein Mastermix herzustellen, der alle Reagenzien außer der Proben-DNA bzw. der Kontrolle enthält. Gegebenenfalls wird zusätzlich je Ansatz interne Kontroll-DNA (siehe 7.4) zugegeben. Entsprechend muss in diesem Fall der Wasseranteil im Mastermix verringert werden.

Das Volumen der einzeln zu pipettierenden Lösungen ergibt sich aus der Anzahl der durchzuführenden PCR-Reaktionen und einem Überschuss von ~ 5%. Vor dem Pipettieren in die PCR-Reaktionsgefäße ist der Master-Mix gut zu mischen.

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die Amplifikation der Mykoplasmen-16S rRNA Gensequenz

Reagenz	Endkonzentration im Einzelansatz
Proben-DNA bzw. Pos./Neg.-Kontrolle	mind. 20 ng
ggf. interne Kontroll-DNA	400 fg
PCR-Pufferlösung (10 x)	1 x
MgCl ₂ ; wenn nicht bereits im PCR-Puffer enthalten	1,5 mmol/l
dNTP-Mix	200 µmol/l (50 µmol/l je dNTP)
Hot-Start Polymerase ¹⁾	1 unit
5' Primer-Mix (5 µmol/l je Primer)	200 nmol/l je Primer
3' Primer-Mix (5 µmol/l je Primer)	200 nmol/l je Primer
H ₂ O	ad 25 µl

7.4.2 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle 3 angegebene Temperatur-Zeit-Programm hat sich bewährt und ist identisch für Ansätze *ohne* oder *mit* interner Kontrolle.

Hinweis: Die Zykluszeiten und -temperaturen für Denaturierung und Annealing im Amplifikationsschritt müssen ggf. je nach Typ des PCR-Geräts angepasst werden.

¹⁾ Im Ringversuch wurde Platinum[®] Taq (Invitrogen) verwendet. Das Entwicklerlabor (DSMZ) hat gleichwertige Ergebnisse auch mit TaKaRa Taq HS[®] erzielt. Gleichwertige Produkte anderer Hersteller können verwendet werden, wenn gezeigt wird, dass sie zu vergleichbaren oder besseren Ergebnissen führen.

²⁾ Der Hersteller Invitrogen gibt 94°C für seine Platinum[®] Taq an. Im Ringversuch wurden 96°C angewendet.

³⁾ Im Ringversuch wurden 15 s Denaturierung und 20 s Annealing angewendet.

Tabelle 3: Temperatur-Zeit-Programm

Schritt	Parameter	Temperatur	Zeit	Zyklen	
1	Initiale Amplifikation	Denaturierung	96 °C ²⁾	2 min	1
2		Anlagerung (Annealing)	65 °C	1 min	
3		Verlängerung (Elongation)	72 °C	1 min	
1	Amplifikation	Denaturierung	94 °C	4-15 s ³⁾	35
2		Anlagerung (Annealing)	65 °C	8-20 s ³⁾	
3		Verlängerung (Elongation)	72 °C	16 s mit 2 s Extension je Zyklus	

7.4.3 Mitzuführende Kontrollen

In jeder Analysenreihe sind grundsätzlich die in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren, Band VI – Gentechnik; Methode G 00.00-5 [6] aufgeführten Kontrollen mitzuführen.

Als Positivkontrollen eignen sich beispielsweise *Mycoplasma*-DNAs aus einer Stammsammlung. Alternativ kann DNA bereits positiv getesteter Proben eingesetzt werden.

Bei PCR-Ansätzen mit interner Kontroll-DNA (siehe 7.4) entsteht in der PCR zusätzlich zum *Mycoplasma*-Amplifikat von ca. 510 bp eine Kontrollbande von 986 bp. Ausnahme sind Proben mit hohem Mykoplasmengehalten, bei denen aufgrund der Konkurrenz keine Kontrollbande entsteht.

7.4.4 Gelelektrophorese

Zur Auswertung der PCR werden 10 µl jedes PCR-Ansatzes auf ein mindestens 1,3 %-iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung der PCR-Fragmente wird nach Anfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff fotografisch dokumentiert.

Andere Elektrophoreseverfahren können bei gleicher Eignung eingesetzt werden.

7.5. Spezies-Identifizierung

Zur Mykoplasmenpezies-Identifizierung kann mit dem erhaltenen PCR-Produkt von ca. 510 bp Länge eine **Restriktionsanalyse** durchgeführt werden.

Ein Restriktionsansatz enthält z. B.:

- 8 µl PCR-Produkt (*direkt aus* PCR-Ansatz ohne interne Kontrolle *oder gereinigt*),
- 1 µl 10 x Restriktionspuffer (*laut Herstellerempfehlung*) und
- 1 µl Restriktionsenzym (*mindestens 1.000 units je nach Enzym*).

Der Ansatz wird 1-2 h bei 37°C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Zur Spezies-Identifizierung kann das Mykoplasmen-PCR-Produkt von ca. 510 bp Länge in Einzelreaktionen mit den Restriktionsenzymen *XbaI*, *HpaII*, *AspI* (Isoschizomere: *PstI*; *Tth111I*) und/oder *HaeIII* (Isoschizomer: *BsuRI*) geschnitten werden (siehe Restriktionsschema, Abb. 1).

Um *Mycoplasma orale* (Risikogruppe 1) zu identifizieren oder auszuschließen, ist beispielsweise nur eine Restriktionsanalyse mit *HpaII* erforderlich.

Alternativ eignet sich zur Spezies-Identifizierung auch die **Sequenzierung** der erhaltenen ~510 bp-Mykoplasmen-PCR-Produkte mit anschließender Genbank-Analyse (z.B. über BlastN).

Es empfiehlt sich hierbei, die beiden ersten 3'-Primer (siehe 4.) einzeln oder gleichzeitig als Sequenzierprimer einzusetzen. Der dritte 3'-Primer bindet zu 100 % nur bei *Acholeplasma laidlawii*, führt aber auch bei anderen *Mycoplasma*-Arten zu guten Sequenzierungsergebnissen, ausgenommen *M. orale*.

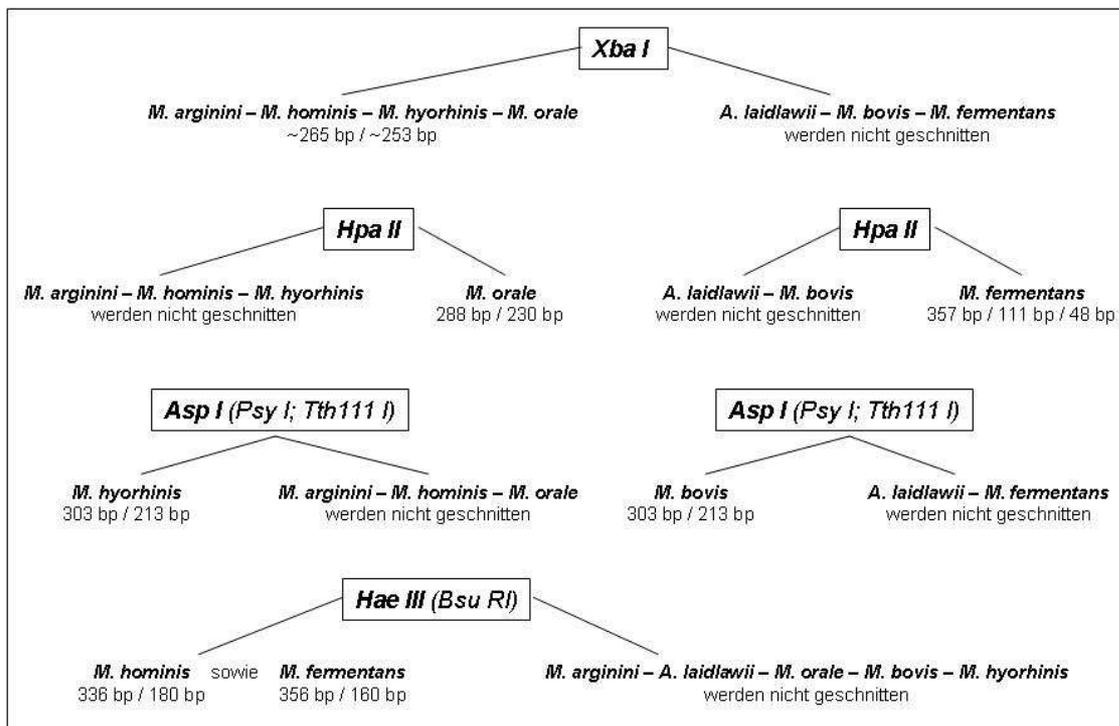


Abbildung 1. Restriktionsschema zur Mykoplasmen-Spezifizierung, modifiziert nach [3]

8 Auswertung

Mykoplasmen- bzw. *Acholeplasma laidlawii*-DNA gilt als nachgewiesen, wenn

- mit der Proben-DNA ein PCR-Produkt von 502 - 520 bp Länge amplifiziert worden ist,
- in den PCR-Kontrollansätzen ohne DNA-Zugabe (PCR-Reagenzienkontrolle, negative Extraktionskontrolle) *kein* PCR-Produkt entstanden ist und
- in der Positivkontrolle ein PCR-Produkt von ca. 510 bp Länge und in den PCR-Ansätzen mit interner Kontrolle ein zusätzliches PCR-Produkt von entsprechender Länge erhalten wurde.

Ergeben die mitgeführten Kontrollen nicht das erwartete Resultat, muss die Analysenreihe verworfen und die Untersuchung nach Durchführung geeigneter Maßnahmen wiederholt werden.

Die Auswertung der Ergebnisse einer Mykoplasmen-Spezifizierung mittels Restriktionsenzymen erfolgt anhand des Restriktionsschemas in Abbildung 1.

Nach erfolgter Speziesidentifizierung mittels Restriktionsanalyse oder Sequenzierung können Aussagen zur Risikogruppe [1] der nachgewiesenen Mykoplasmen gemacht werden:

Risikogruppe 1: *Mycoplasma orale*

Risikogruppe 2: *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginini*, *M. bovis*, *M. fermentans*, *M. hominis*,
M. hyorhinitis, *M. pneumoniae*, *M. salivarium*, *M. synoviae*

9 Leistungsmerkmale der Methode

9.1. Sensitivität, Spezifität und Genauigkeit

In einer Studie von 2001 wurden insgesamt 598 Proben von 377 verschiedenen Zelllinien mit dem hier beschriebenen PCR-Verfahren und außerdem mittels DNA-RNA-Hybridisierung und mittels Agarkultur untersucht [2]. Das PCR-Verfahren war dabei mit einer Sensitivität von 86% und einer Spezifität von 93% das am besten geeignete Nachweisverfahren. Der *Mycoplasma*-Befall der Zellkulturen wurde mit 92% Genauigkeit erfasst. Diese Daten wurden wie folgt ermittelt (und jeweils mit 100% multipliziert) [2]:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch negativer})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch positiver})}$$

$$\text{Genauigkeit} = \frac{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl richtig negativer})}{\text{Gesamtzahl der Proben}}$$

Eine exakte Bestimmung der Sensitivität des Mykoplasmen-PCR-Nachweisverfahrens ist zurzeit nur schwer möglich. Die Bereitstellung von geeignetem Referenzmaterial zur Quantifizierung von Mykoplasmen gelingt bisher nicht, weil die Bestimmung von koloniebildenden Einheiten (cfu) aufgrund der ständigen starken Verklumpung der Bakterien schwierig ist.

9.2. Nachweisgrenze der Mykoplasmen- PCR

Für eine ungefähre Bestimmung der Nachweisgrenze wurden reine Mykoplasmen-Kulturen auf Agar angezogen und die DNA extrahiert [2]. Die DNA-Ausbeute betrug ca. 300 ng in 20 µl (Uphoff, persönl. Mitteilung).

Die Genomgrößen von Mykoplasmen liegen zwischen 610 kb für *Mycoplasma arginini* und 1.680 kb für *Acholeplasma laidlawii* [9]. Unter der Annahme einer mittleren Genomgröße von 1.000 kb entsprechen 300 ng DNA demnach 3×10^8 Mykoplasmen-Genomen (1 ng DNA = 10^6 Mykoplasmen-Genome oder 1 fg = 1 Mykoplasmen-Genom mit einer Größe von 1.000 kb).

Die PCR-Analyse mit Verdünnungsreihen der DNA ergab, dass 1 µl einer 1: 100.000 Verdünnung der Original-DNA-Lösung noch detektiert werden konnte, das entspricht 150 fg (Uphoff, persönl. Mitteilung). Daraus lässt sich für das PCR-Verfahren nach Uphoff et al. [2] eine ungefähre Nachweisgrenze von 150 Mykoplasmen-Genomkopien ableiten.

9.3. Ringversuch

Im Oktober 2010 wurde im Unterausschuss „Methodenentwicklung“ der B/LAG „Gentechnik“ ein Ringversuch mit dieser Methode durchgeführt, an dem 10 Laboratorien teilnahmen. Die Teilnehmer erhielten jeweils 16 codierte Proben (Hersteller: DSMZ; siehe Tabelle 4):

- **8 Proben** auf Trockeneis: gefrorene **Zellpellets** (jeweils 5×10^6 Zellen; in 1 x PBS gewaschen)
- **8 Proben** ungekühlt: **Zellkultur-Überstände** (jeweils 2 x 1 ml; aus Zellkulturflaschen nach 30 Minuten Absetzzeit abpipettiert)
- **Positiv-Kontrolle**; ca. 50 µl genomische DNA-Lösung von *Mycoplasma arginini* (1 µg/ml; DSMZ) Vor Einsatz in der PCR musste diese 1:40 verdünnt werden (= 25 pg/µl).
- **Interne Kontrolle**; ca. 50 µl Plasmid-DNA-Lösung (1 µg/ml; DSMZ)⁴⁾ Vor Einsatz in der PCR musste diese 1:10.000 verdünnt werden (= 100 fg/µl).

Die gefrorenen Zellpellets waren bis zur Verwendung bei -20°C zu lagern. Die Überstände konnten entweder sofort verarbeitet oder bei +4°C gelagert werden, wenn die Verarbeitung innerhalb von 2-3 Tagen erfolgte. Andernfalls mussten die Überstände eingefroren und nach dem Auftauen sofort verarbeitet werden. Die Kontrollen konnten bis zur Verwendung bei 4°C gelagert oder eingefroren werden.

Tabelle 4: Probenbeschreibung (gilt gleichermaßen für Zellpellets und Überstände)

<u>Zelllinie</u>	<u>Mycoplasma-Spezies</u>
L-82 (Anaplastic Large Cell Lymphom Zelllinie, Mensch)	ohne
JURKAT (T- Zell Leukämie- Zelllinie; Mensch)	<i>Acholeplasma laidlawii</i>
CAT-13.6E12 (Hybridom-Zelllinie, Maus)	ohne
L-929 (Bindegewebe- Fibroblasten-Zelllinie, Maus)	ohne
MKB-1 (T- Zelllinie, Mensch)	<i>Mycoplasma orale</i>
MHH-CALL-4 (B- Zell Vorläufer Leukämie-Zelllinie, Mensch)	ohne
EB-3 (Burkitt Lymphom-Zelllinie, Mensch)	<i>Mycoplasma fermentans</i>
DOHH-2* (B- Zell Lymphom-Zelllinie, Mensch)	(<i>Mycoplasma hyorhinis</i>)*

* In einer Nachuntersuchung der Zellüberstandsproben bzw. Zellpelletproben aus der Zelllinie DOHH-2 wurde festgestellt, dass diese nicht wie angenommen mit Mykoplasmen infiziert war. Diese Proben wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Des Weiteren erhielten alle Ringversuchsteilnehmer:

- 1 x QIAamp DNA Mini Kit (50), Fa. QIAGEN
- 1 x Platinum Taq DNA Polymerase (100 react.), Fa. Invitrogen
- 10 Oligonukleotide (10 nmol- Maßstab), Fa. BioTez

⁴⁾ Das Plasmid basiert auf dem pGEM-T- Vektor und enthält das 510 bp- PCR- Amplifikationsprodukt von *A.laidlawii*. Durch Insertion eines zusätzlichen 476 bp- (*stuffer*) DNA-Fragments entsteht nach Amplifikation ein 986 bp großes PCR-Produkt, welches auf dem Agarose-Gel gut von den 502-520 bp großen Amplifikationsprodukten der Mykoplasmen-16S rRNA Gene zu unterscheiden ist. Das Kontrollplasmid ist ca. 3990 bp groß [2].

Die DNA-Extraktion erfolgte je Probe in doppelter Ausführung mit dem QIAamp® DNA Mini Kit aus jeweils der Hälfte des Zellpellet-Materials bzw. aus jeweils 1 ml Zellkulturüberstand nach den Herstellerangaben.

In der PCR wurden jeweils 4 µl DNA-Extrakt (16 – 312 ng) verwendet, einmal *mit* und einmal *ohne* Zusatz von 4 µl interner Kontrolle (siehe oben). Die PCR erfolgte nach [2] mit einem leicht modifizierten Zeitregime:

- Vorlauf und Zyklenzahl wie angegeben
- **15 sec** Denaturierung bei 94°C
- **20 sec** Annealing bei 65°C
- 16 sec Elongation + 2 sec. Extension je Zyklus

Folgende PCR-Geräte wurden von den Teilnehmern eingesetzt: *Eppendorf Mastercycler* (4 x), *Biometra T3* (3 x), *AB 2700* (1 x), *AB 7500* (1 x).

9.3.1 Ergebnisse der *Mycoplasma*-PCR im Ringversuch

Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Ringversuchsergebnisse PCR-Nachweis

Anzahl teilnehmender Laboratorien	10
Anzahl Laboratorien, die Ergebnisse vorgelegt haben	9
Anzahl Proben je Laboratorium	16
Anzahl der angenommenen Ergebnisse	112*
Anzahl Proben, die aus Zellkulturüberständen bestanden und Mykoplasmen enthielten	24
Anzahl Proben, die aus Zellpellets bestanden und Mykoplasmen enthielten	32
Anzahl Proben, die aus Zellkulturüberständen bestanden und keine Mykoplasmen enthielten	24
Anzahl Proben, die aus Zellpellets bestanden und keine Mykoplasmen enthielten	32
Falsch positive Ergebnisse	1 (0,9 %)
Falsch negative Ergebnisse	0

* In einer Nachuntersuchung der Zellüberstandsproben bzw. Zellpelletproben aus der Kultur der Zelllinie DOHH-2 wurde festgestellt, dass diese nicht wie angenommen mit Mykoplasmen infiziert war. Diese Proben wurden daher nicht in die Auswertung einbezogen.

Die Ergebnisse eines Labors wurden nicht gewertet, da es hier zu einer Kontamination der Proben gekommen war. Dieses Labor bewertete von acht negativen Proben sechs falsch-positiv. In fünf dieser Proben ergab die Speziesbestimmung *Mycoplasma fermentans*.

Es wird empfohlen, *keine Reamplifikation* von PCR-Produkten durchzuführen, etwa, um genügend Material für die Speziesbestimmung zu gewinnen. Ergibt eine *Mycoplasma*-Nachweis-PCR keine ausreichende Menge Amplifikat für weitergehende Analysen, sollte die betreffende Probe als negativ bewertet werden. Zur Absicherung des Ergebnisses sollte die entsprechende Zellkultur ggf. zu einem späteren Zeitpunkt erneut beprobt und untersucht werden.

9.3.2 Ergebnisse der Speziesidentifizierung im Ringversuch

In 47 von 48 Proben, die Mykoplasmen enthielten, wurde die Spezies richtig bestimmt (97,9 %). Drei Labore wendeten dabei die Restriktionsanalyse an, drei Labore die Sequenzierung und zwei Labore beide Methoden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Ergebnisse der Speziesidentifizierung im Ringversuch

<i>Mycoplasma</i>-Spezies (n = Anzahl Proben)	Identifizierung mittels Restriktionsanalyse	Identifizierung mittels Sequenzierung
<i>Mycoplasma orale</i> (n= 16)	15 Proben richtig erkannt / 1 Probe falsch identifiziert	16 Proben richtig erkannt
<i>Mycoplasma fermentans</i> (n= 16)	16 Proben richtig erkannt	16 Proben richtig erkannt
<i>Acholeplasma laidlawii</i> (n= 16)	16 Proben richtig erkannt	16 Proben richtig erkannt

Die Methode ist für den qualitativen DNA-Nachweis von Mykoplasmen-Kontaminationen in Zellkulturen geeignet. Die Speziesbestimmung kann sowohl mittels Sequenzierung als auch durch Restriktionsanalyse sicher erfolgen.

9.3.3 Lebensfähigkeit der nachgewiesenen Mykoplasmen

Im Ringversuch überprüfte ein Labor die Lebensfähigkeit von Mykoplasmen in Ringversuchsproben, die in der PCR positiv getestet worden waren. Der Test erfolgte in den unbehandelten Zellkulturüberständen mit einem kommerziellen Kit (MycoAlert[®] Kit, Fa. Lonza). In allen drei betreffenden Überständen waren lebensfähige Mykoplasmen nachweisbar.

Diese Untersuchung war optional.

Ein Test auf Lebensfähigkeit der Mykoplasmen kann sich anschließen. Dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die ggf. weitere Geräte oder Hilfsmittel erfordern.

Eine Kultivierung der Mykoplasmen auf Spezialagar ist grundsätzlich ebenfalls möglich [10].

9.3.4 Abschätzung der Nachweisgrenze im Ringversuch

Zur Abschätzung der Nachweisgrenze wurden im Ringversuch von 8 Laboren Verdünnungsreihen der Positiv-Kontrolle (1 µg/ml genomische *Mycoplasma arginini*-DNA; DSMZ) hergestellt und in der PCR ohne Zusatz von interner Kontroll-DNA analysiert.

In allen 8 Laboren wurden 4 µl einer 1:1.000.000-Verdünnung noch detektiert. Dies entspricht theoretisch 6 Genomkopien von *M. arginini* bei einer vorausgesetzten Genomgröße von 610 kb [9].

10 Schrifttum

- [1] TRBA 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen“, Ausgabe: Dezember 2010, GMBI. Nr. 68-80 vom 6. Dezember 2010, S. 1428-1667.
- [2] Uphoff C.C. et al. (2002) *Comparative PCR Analysis for Detection of Mycoplasma Infections in Continuous Cell Lines*. In *Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal* 38: 79-85
- [3] Uphoff C.C. et al. (2005) *Detection of Mycoplasma Contaminations*. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 290: Basic Cell Culture Protocols, Third Edition, Edited by C.D. Helgason and C.L. Miller. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey

- [4] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, Band VI (G), G 00.00-2: Begriffe und Definitionen. Beuth-Verlag
- [5] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, Band VI (G), G 00.00-4: Verfahren zur Nukleinsäureextraktion – Allgemeine Hinweise und Anforderungen. Beuth-Verlag
- [6] Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 28b GenTG, Band VI (G) G 00.00-5: Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) - Allgemeine Hinweise und Anforderungen. Beuth-Verlag
- [7] Ausubel et al. (ed), (1989). *Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue*. In: Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY. John Wiley & Sons
- [8] Miller, S.A. et al. (1988). *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. Nucleic Acids Research 16, 1215
- [9] Weisburg, W.G. et al. (1989). *A Phylogenetic Analysis of the Mycoplasmas: Basis for their Classification*. Journal of Bacteriology 171(12): 6455-6467.
- [10] Uphoff, C.C. et al. (1992). *Sensitivity and Specificity of Five Different Mycoplasma Detection Assays*. Leukemia 6 (4): 335-341