

Evaluación preanalítica de dos métodos de extracción de ADN para la amplificación del gen 16S RNA de *Mycoplasma spp.* en sangre periférica

Rayo Santellán Olea¹, Antonio Rivera², Constantino Gil Juárez², Antonio Yañez Santos³, Cristian Román Méndez³, Lilia Cedillo Ramírez⁴

Posgrado en Ciencias Ambientales¹, Laboratorio de Micoplasmas², Laboratorio de Investigación en Microbiología Oral³, Centro de Detección Biomolecular⁴

Instituto de Ciencias^{1,2} Facultad de Estomatología³

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Puebla, Pue., México

rso2730@live.com.mx, lcedil9@gmail.com

Abstract— Molecular analysis, including the polymerase chain reaction (PCR) have become an important tool in medical diagnosis because of its specificity and diagnostic shortest time. Extraction and purification of nucleic acids is critical, especially from biological samples such as sputum, exudates, biopsies and blood. The aim of the study was to compare two different DNA extraction techniques from peripheral blood containing different concentrations of *Mycoplasma fermentans* PG18, we used a commercial kit Roche and a conventional method. The results allowed us to obtain good quality and quantity of DNA using the Roche Kit, which detect up to 1000 CFU / ml, but the trade protocol detected only 10,000 CFU / ml, plus a smaller fragment nonspecific in all dilutions. Roche kit can be a suitable alternative for extraction of DNA from samples suspicious of being infected with *Mycoplasma spp.*

Keyword— a) *Mycoplasma* b) DNA extraction c) 16S rRNA gene amplification

Resumen— Los análisis moleculares, entre ellos la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se han convertido en una herramienta de diagnóstico médico importante debido a su especificidad y menor tiempo de diagnóstico. La extracción y purificación de ácidos nucleicos es de vital importancia, principalmente a partir de muestras biológicas como esputo, exudados, biopsias y sangre. El objetivo del trabajo fue comparar dos técnicas distintas de extracción de ADN a partir de sangre periférica contaminada con distintas concentraciones de *Mycoplasma fermentans* PG18, usamos un Kit comercial Roche y un método convencional. Los resultados obtenidos nos permitieron obtener buena calidad y cantidad de ADN mediante el Kit Roche, el cual nos permitió detectar hasta 1000 UFC/ml, sin embargo el protocolo comercial solo detectó 10,000 UFC/ml, además de un fragmento inespecífico de menor tamaño en todas las diluciones. El kit de Roche puede ser una alternativa adecuada para la extracción de ADN a partir de muestras sospechosas de estar infectadas con *Mycoplasma spp.*

Palabras claves—*Mycoplasma*, extracción de ADN, amplificación del gen 16S rRNA

I. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de biología molecular especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han permitido el desarrollo de novedosos y oportunos protocolos de diagnóstico que han sido estandarizados y validados, presentan ventajas en cuanto a sensibilidad, especificidad rapidez y versatilidad además de que permiten la identificación directa de un gran número de microorganismos [1].

Los micoplasmas son microorganismos que se distribuyen en diversas comunidades bióticas cuya característica distintiva es su tamaño diminuto (0.2 y 2 μm) y la carencia de pared celular [2], crecen en cercana interacción con las células de mamíferos por largos periodos de tiempo, afectando significativamente de manera gradual y progresiva propiedades biológicas de la célula hospedera, ya que

se ha demostrado que modulan la inmunorreactividad y suprimen sistemas de señalización responsables de los procesos inflamatorios, actualmente se ha demostrado que los micoplasmas son capaces de inducir transformación maligna en células mononucleares de sangre periférica por lo que se les asocia a crecimiento tumoral de células humanas [3, 4]. Las infecciones de tipo fulminante son raras, siguen un curso crónico debido a que poseen habilidades adaptativas únicas que les permite superar diversos mecanismos de defensa del huésped, en humanos están asociados con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), fatiga crónica, esclerosis lateral amiotrófica, Lupus eritematoso sistémico y aterosclerosis [5, 6, 7], ya que se ha demostrado su presencia en diferentes sitios como articulación, pulmón, cerebro, arteria coronaria, etc. [8]. Diversos métodos tradicionales de diagnóstico histológico, inmunológico y de cultivo para la identificación de micoplasmas han sido desarrollados [9, 10]. Sin embargo estos tienen baja sensibilidad y especificidad, además de que se requieren de aproximadamente 28 días para obtener resultados debido por un lado a que los requerimientos nutricionales utilizados para su multiplicación in vitro en medios de cultivo son sofisticados, así como a la sensibilidad de estos microorganismos a cambios de pH, temperatura, presión osmótica, rayos ultravioleta y agentes tensoactivos [11, 12]. Las especies patógenas *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma pneumoniae* son las últimas buscadas en el contexto de las enfermedades infecciosas, debido a la percepción clínica extendida que se tiene de la importancia menor de estas bacterias y solo son buscados después de fallar en la detección de otros microorganismos [13]. El procedimiento de extracción de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) a partir de muestras biológicas tiene un impacto significativo en la sensibilidad y reproducibilidad de la prueba de diagnóstico molecular. Por ello es de vital importancia estandarizar previamente la metodología con modelos experimentales, para luego proceder a realizarlos con muestras clínicas [14]. El objetivo de este trabajo fue comparar dos protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica para su posterior empleo en la detección de ADN de micoplasmas mediante PCR. Para ello, se utilizó el equipo estandarizado comercial High Pure PCR template preparation Kit (Roche) y un protocolo convencional no comercial que utiliza una solución reguladora para la lisis nuclear y solventes orgánicos a fin de establecer cuál de las dos proporciona mejor rendimiento, pureza e integridad de ADN en muestras que combinan células humanas y de micoplasmas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de Micoplasmas

Se cultivó la cepa *Mycoplasma fermentans* PG18 ATCC 19989 donada por la Dra. Gail H. Cassell de la Universidad de Alabama Birmingham, en medio EATON suplementado con suero fetal bovino al 10%, se incubó a 37°C hasta el estado de fase logarítmica y se sembró 10 µl en placas con agar EATON para determinar las UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonia). A partir de 20 ml del cultivo en fase logarítmica se realizó la extracción de ADN mediante la técnica de extracción con tiocianato de guanidina 5M cloroformo-alcohol isoamílico, según lo descrito por Pitcher et. al [15]. Se lavó y secó el ADN y se resuspendió en 100 µl de TE (Tris-EDTA). El ADN obtenido fue utilizado como control positivo de PCR para el género *Mycoplasma spp.*

Toma de muestra e inoculación

Para ambos procedimientos de extracción de ADN, se tomaron muestras de sangre periférica de voluntarios sanos obtenidas en tubos estériles con EDTA (1,6 mg/ml), las cuales fueron inoculadas con diferentes concentraciones de *Mycoplasma fermentans* PG18 partiendo de 10⁶ UFC/ml. Para ello se colocó en 5 tubos de ensaye 1 ml de sangre, al primer tubo se le agregó 100 µl de la bacteria (concentración final de 10⁵ UFC/ml), a partir de esta se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta el tubo

5, se dejó reposar por 15 minutos a 37°C y se procedió a la extracción de ADN. Como control negativo se utilizó sangre sin inocular.

I) Protocolo de Extracción de ADN con solución reguladora para la lisis nuclear NBL-SDS (Regulador Lisis Nuclear- Dodecilsulfato sódico). 1ml de la sangre periférica (inoculada con la bacteria y sin inocular) se resuspendió en 600 µl de un regulador para la lisis nuclear (10 mM Tris-HCl pH 8.2, 0.4M de NaCl, 2 mM Na₂ EDTA pH 8.0, SDS 10% p/v), se adicionaron 250 µl de NaCl 6M, se mezcló por inversión durante 5 minutos y se centrifugó a 4,000 rpm por 5 minutos se recuperó la fase acuosa y se realizó la extracción de los ácidos nucleicos con cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se precipitó con acetato de amonio 3M y alcohol absoluto frio. El ADN se lavó dos veces con etanol al 70%, se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió en 100 µl de TE estéril (Tris 10 mM EDTA 1 mM), se almacenó a -20°C hasta su uso [16].

II) Protocolo comercial High Pure PCR template preparation Kit (Roche). Se utilizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante [17]. Se tomaron 200 µl de cada una de las muestras de sangre periférica (inoculada con la bacteria y sin inocular) y se mezclaron con 200 µl de un tampón binding y 40 µl de proteinasa K, se incubó a 70°C por 10 minutos y al término se adicionaron 100 µl de isopropanol, se transfirió a las columnas High Pure y se realizaron 3 lavados para finalmente eluir el ADN y almacenar a -20°C hasta la realización de la técnica de PCR.

Determinación de la concentración y pureza de ADN

Se siguieron los métodos descritos por Sambrook et al. 2001 [18]. La concentración de ADN fue determinada en un nano-espectrofotómetro NanoPhotometer™ Pearl a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm y la pureza se determinó estableciendo la relación absorbancia 260 nm/280 nm.

Técnica de PCR para la identificación del género Mycoplasma spp.

Se utilizó el protocolo de Sidhu et. al [19] empleando los iniciadores AR1 5' ATG RGG RTG CGG CGT ATT AG 3' y AR2 5' CKG CTG GCA CAT AGT TAG CCR T 3' para amplificar una secuencia conservada de 301 pb del gen 16S ARN (Ácido Ribonucleico) del género *Mycoplasma spp.* el protocolo fue adaptado a las condiciones del laboratorio. Se preparó una mezcla de reacción con 12.5 µl de PCR Master Mix (2X) *Thermo Scientific*, (0.05 U/µl Taq DNA polimerasa, regulador de reacción (4 mM MgCl₂, 0.4 Mm de dATP, dCTP, dGTP dTTP), 10 pM de cada iniciador y 5 µl de ADN molde en un volumen final de 25 µl. Como control negativo de la PCR se utilizó ADN humano sin inocular. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador Techne TC-412 (SciePlas), con un programa que consiste de 5 min a 95 °C; 30 ciclos de: 20 seg a 95 °C, 15 seg a 55 °C, 65seg a 72 °C cada uno y un paso de extensión final de 5 min a 72 °C.

La calidad e integridad del ADN así como los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, utilizando el regulador TAE (Tris-ácido acético 40 mM, EDTA 0.5 M pH 8.0). La separación del ADN se realizó en una cámara de electroforesis (Scientific R Electroforesis Cell), empleando un voltaje de 70-100 V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0,5 ug/ml) y las bandas se visualizaron mediante un Foto documentador BIO-RAD Molecular Imagen® (ChemicDoc™ XRS+) con un software ImageLab™ para generar las imágenes correspondientes. El tamaño de las bandas de ADN se estimó comparándolas con el marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV 100 pb (BIOLINE) para los productos de PCR.

Análisis estadístico

Las diferencias en la concentración y calidad de ADN se analizaron por medio de la prueba t de student con una significancia de 0.05.

III. RESULTADOS

La extracción de ADN es importante para la realización de pruebas moleculares diagnósticas, para ello se evaluó el rendimiento y pureza de dos protocolos de extracción de ADN. El protocolo con el regulador para la lisis nuclear permitió extraer mayor cantidad de ADN con un promedio de 238.60 ng/μg en comparación con el protocolo comercial de Roche obteniendo una media de 75.73 ng/μg, mostrando una diferencia significativa de (P < 0.05). La determinación del índice de pureza del ADN extraído por los protocolos descritos, fue evaluada a partir de los promedios de las relaciones de absorbancia a 260 nm/280 nm. Los resultados para el protocolo comercial de Roche las relaciones de absorbancia presentaron valores medios de 1.79 nm a diferencia del protocolo con Tampón lisis la cual presentó promedio de 3.37 nm (**Tabla I**), observando que las relaciones obtenidas por este protocolo estaban por abajo de los valores esperados para obtener un ADN puro observando que a mayor concentración de ADN obtenido la pureza tendió a disminuir, el análisis estadístico arrojó una diferencia significativa (P = 0.034) entre el ADN extraído con el protocolo que utiliza una solución reguladora para la lisis nuclear y el protocolo comercial de Roche.

Tabla I. Rendimiento y pureza del ADN extraído mediante dos protocolos

Protocolo	Concentración ng/μl 10 6 cel (260 nm) Valor mín.-valor máx.	μ (± DS)	Índice de Calidad (260/280 nm) Valor mín.-valor máx.	μ (± DS)
Regulador lisis nuclear	47.90-1167	246.29 a (± 238.66)	2.130 -4.890	3.379 a (± 0.8592)
Comercial High pure Roche	16.500-634.00	75.73 a (±102.48)	1.714 - 1.916	1.796 a (± 0.03987)

*Diferencias estadísticamente significativas (p< 0.0001)

La integridad del ADN se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, mediante el protocolo convencional que usa una solución reguladora para la lisis nuclear se observó un extendido a lo largo de todo el carril, evidenciando degradación de ADN Carriles 2 a 12 (**Figura A**), a diferencia del protocolo comercial de Roche permitió obtener un ADN con mayor integridad observándose una banda única Carriles 2 a 10 (**Figura B**), se observan las bandas de ADN obtenidas por este procedimiento por encima del Marcador de Peso Molecular (MPM) 1000 pb HyperLadder™ Carril 1.

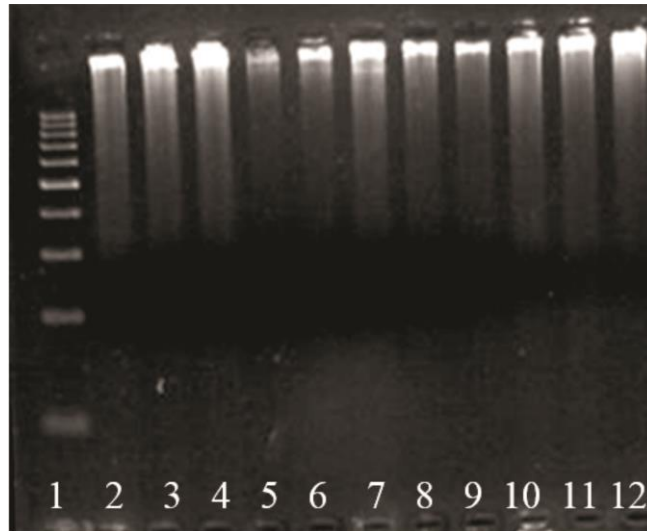


Figura A. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, ADN extraído mediante el protocolo convencional.

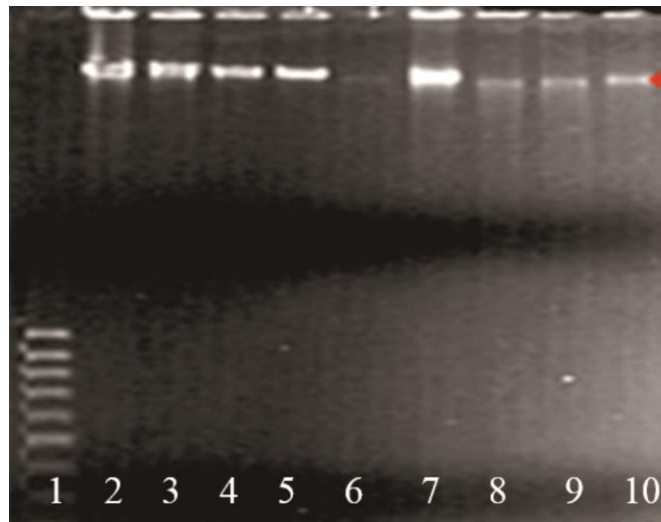


Figura B. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, ADN extraído mediante el protocolo comercial.

Se empleó la técnica de PCR previamente estandarizada y validada para la amplificación de un fragmento de 301 pb del gen 16S ARNr específico del género *Mycoplasma*. Mediante el protocolo convencional que utiliza la solución reguladora para la lisis nuclear solo las dos primeras diluciones presentaron amplificado, sin embargo en todas las diluciones se observó la presencia de una banda inespecífica de aproximadamente 180 pb que no corresponde a *Mycoplasma spp.* Carril 2 a 6 diluciones seriadas de 10^5 a 10^3 UFC/ml, Carril 7 ADN total de micoplasma, Carril 8 ADN total de humano (**Figura C**). A diferencia del protocolo de Roche encontramos que el amplificado se presentó hasta la dilución 10^{-3} (1,000 UFC/ml) carril 1 a 5 diluciones seriadas de 10^5 a 10^3 UFC/ml. carril 6 ADN total de micoplasma, Carril 7 ADN total de humano, Carril 8 MPM (100 pb HyperLadder™) l **figura D**.

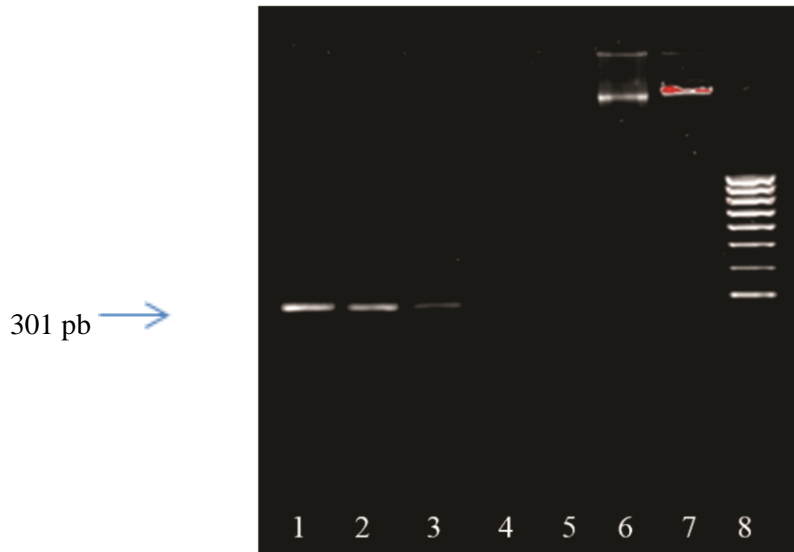


Figura C. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%, amplificado específico para micoplasmas, protocolo convencional.

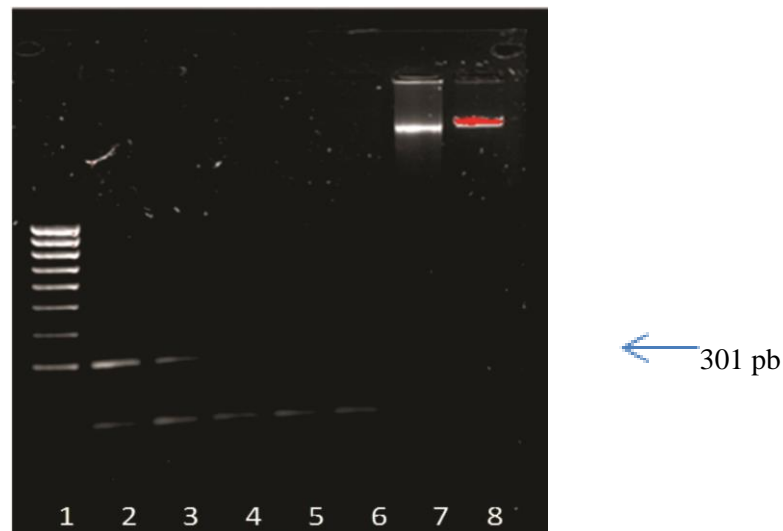


Figura D. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%, amplificado específico para micoplasmas, protocolo comercial.

IV DISCUSIÓN

La elección de un protocolo adecuado para la extracción de ADN es un punto crítico para la amplificación mediante la técnica de PCR [20]. La mayoría de las técnicas están basadas en extracción con solventes orgánicos, presentan inconvenientes en cuanto a tiempo, laboriosidad, costos y toxicidad. Los ensayos de extracción deben ser sencillos, rápidos, reproducibles, económicos y seguros [1, 21].

Por tal motivo se estandarizaron y evaluaron dos protocolos de extracción a partir de sangre periférica inoculada con cultivo de *Mycoplasma fermentans PG18*. Un protocolo basado en el procedimiento clásico de extracción con solventes orgánicos utilizando una solución reguladora para la lisis nuclear y otro, utilizando un kit de extracción comercial. Los métodos basados en la amplificación

de ADN (PCR) muestran un gran potencial como herramienta diagnóstica no invasiva. En los años recientes la amplificación con genes universales de la región 16S ARNr ha mostrado gran especificidad para la detección de micoplasmas patógenos en muestras biológicas [22].

En la extracción de ADN con el regulador para lisis nuclear se obtuvo mayor rendimiento que en la extracción con el protocolo comercial, permitiendo extraer tres o hasta cuatro veces más ADN. Sin embargo el ADN no tiene una pureza dentro del rango permitido debido posiblemente a que el protocolo incluye gran cantidad de pasos que lo hacen largo y laborioso, además que se utilizan solventes contaminantes, tóxicos lo cual puede explicar la presencia de bandas inespecíficas en la PCR, no excluyendo la posibilidad que estos valores estén sobrestimados por contaminación con ARN que pudiese estar en la muestra, en comparación con el método comercial [23].

Cuando se evaluó la pureza del ADN extraído por el método comercial, se logró obtener mejores resultados esto puede ser debido a que el protocolo empleó tratamiento con ARNasas y proteinasa K que ayudan a obtener muestras de ADN más puras, dicho tratamiento produce un aumento significativo en el costo del protocolo. Sin embargo se logra observar una banda específica de 301 pb. (**Fig C y D**).

Si bien es cierto que, con la técnica que utiliza una solución reguladora para la lisis nuclear se obtuvo, una menor pureza e integridad, ésta fue eficiente para lograr obtener un ADN que permitió producir un producto de amplificación de 301 pb de la secuencia del ADN del gen 16S ARNr del género *Mycoplasma spp.* Es importante mencionar que a pesar de la aparente fragmentación del ADN, al ser la diana a amplificar un fragmento de tamaño pequeño y altamente repetitivo, se aumenta la probabilidad de que se produzca la amplificación por PCR [24].

Basados en nuestros resultados, concluimos que ambos protocolos pueden ser implementados en el laboratorio, ya que son eficientes en la obtención de ADN de muestras de sangre. Sin embargo a pesar de que el método no comercial disminuyó los costos con respecto al protocolo comercial, este último evita la preparación de reactivos, lo cual disminuye el tiempo empleado en la determinación. El equipo comercial es una buena elección si el objetivo es implementar esta metodología en la práctica diaria.

La técnica de extracción de ADN con el protocolo comercial de Roche, es una técnica que mostró ventajas en cuanto a sencillez, rapidez, reproducibilidad y seguridad para el operador, ya que no requiere la exposición a solventes orgánicos peligrosos para el personal que realiza estos procedimientos. Además, dicha técnica permite procesar un gran número de muestras. Por lo que podría sugerirse su uso como técnica de extracción de rutina en laboratorios que estén orientados al diagnóstico de la enfermedad por micoplasmas.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece al Posgrado en Ciencias Ambientales del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo otorgado para la realización del presente proyecto, así como al Dr. Rubén Sánchez Pérez cardiólogo de la Fundación Madonna di Guadalupe.

REFERENCIAS

- [1] Volokhov, DV., Graham, LJ., Brorson, KA., Chizhikov, VE. (2011) Mycoplasma testing of cell substrates and biologics. Review of alternative non-microbiological techniques. Moll cell probes. 25: 69-77
- [2] Razin, S., Yogeve, D., Naot, Y. (1998) Molecular Biology and pathogenicity of mycoplasma. Microbiol Mol Biol. 62: 1094-1156

- [3] Razin, S., Hayflick, L. (2010) Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. *Biologicals*. 38:183-190
- [4] Citti, C., Blanchard, A. (2013) Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiol*. 21 (4): 196-203
- [5] Kenney, RT., Li, SJ., Wallace, CA., Wall, CT., O'Connor, MC., Campbell, TP., Trigt, VP., Corey, GR. (1993) Mycoplasmal Pericarditis. Evidence of Invasive Disease. *Clin Infec Dis*. 17(1): S58-S62
- [6] Vojdani, A., Choppa, PC., Tagle, C., Andrin, R., Samimi, B., Lapp, CW. (1998) Detection of *Mycoplasma genus* and *Mycoplasma fermentans* by PCR in patients with Chronic Fatigue Syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 22 (4): 355-365
- [7] Constantino, G., Sanchez, GA., Lecona, LI., Rivera, A., Santellan, OR., Cedillo L. (2014) Detection of Mycoplasmas in patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Adv in Microbiol*. 4:712-719
- [8]. Yáñez, SA., Martínez, RA., Calixto, T., González, MFJ., Rivera, TA., Giono, CS., Gil, JC. Cedillo R. L. (2013) Animal model of *Mycoplasma fermentans* respiratory infection. *BMC Res Not*. 6 (9): 1-7
- [9] Afshar, B., Pitcher, D., Nicholas, RAJ., Miles, RJ. (2008) An evaluation of PCR methods to detect strains of *Mycoplasma fermentans*. *Biologicals*. 36: 117-121
- [10] Meseguer-Peinado, MA., Acosta-Boga, B., Matas-Andreu, L., Codina-Grau, G. (2012) Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasmas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30 (8): 500-504
- [11] Baseman, JB., Tully, JG. (1997) Mycoplasmas: sophisticated, reemerging and burdened by their notoriety. *Emerg Infect Dis*. 3 (1): 21-32
- [12] Rottem, S. Interaction of Mycoplasmas with host cells. (2003) *Physiol Rev.*, 83: 417-432
- [13] Rodríguez-Preval, N., Fernández-Molina, C., Rodríguez, GI., Berdasquera, CD., Rivera-Tapia, JA. (2007) PCR-Multiple para el diagnóstico de *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 24 (2): 152-156
- [14] Hernández, Y., Lobo, E., Martínez, SZL. (2009) Evaluación de diferentes métodos de extracción de AND de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. *Rev Salud Anim*. 31 (2): 108-114
- [15] Pitcher, DG., Saunders, NA., Owen, RJ. (1998) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with Guanidium Thiocyanate. *Lett Appl Microbiol*. 8: 151-156
- [16] Miller, SA., Dykes, DD., Polesky, HF. A. (1998) Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.. *Nucleic Acid Res*. 16 (3): 1215
- [17] Degen, Hans-Joachim., Deufel, A., Eisel, D., Gruewald-Janho, S., Keesey, J. (2006) Primer design and Template preparation. In: *PCR Application manual*. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim. Germany (3rd edition) p. 54
- [18] Sambrook, J., Russell, D. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3ra Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001
- [19] Shidu, MK., Rashidbaigi, A., Testa, D., Liao, MJ. (1995) Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. *FEMS Microbiol Lett*. 128: 207-212.
- [20] Mullis, K., Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol*. 55: 335-350
- [21] Sung, H., Kang, SH., Bae, JY., Hong, TJ., Chung, BY., Lee, Chong-Kil., Song, S. (2006) PCR-Based Detection of *Mycoplasma* species. *J Microbiol*. 44 (1): 42-49

- [22]. Timenetsky, J., Santos, LM., Buzinhani, M., Mettifogo, E. (2006) Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Brazilian J. Biol. Res.* 39: 907-914
- [23] Yan, Z., Mayhew, A., Seng, N., Takle, GB. (2010) Validation of a PCR method for detection of mycoplasmas according to European Pharmacopoeia Section 2.6.7. *Biologicals.* 38: 232-237
- [24] Lehmann, D., Jouette, S., Olivieri, F., Laborde, S., Rofel, C., Simon, E., Metz, D., Felden, L., Ribault, S. (2010) Novel sample preparation method for molecular detection of Mollicutes in cell culture samples. *J Microbiol Methods.* 80:183-189