Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation and Detection of *Mycoplasma pneumoniae* from Cell Culture by Culture and PCR

Salimeh Ahangaran[1], Seyyed Ali Pourbakhsh*[1], Alireza Abtin[2], Esmaeel Asli[1]

1. Mycoplasma Reference laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
2. Department of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Article Information

Article Subject:
Molecular Microbiology

10.30699/ijmm.13.3.153

Corresponding author:
Seyyed Ali Pourakbari
Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
Email:
poursaba@gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Mycoplasma* pneumoniae is one of the species of mycoplasmas which could contaminate cell cultures. Identification of *M. pneumoniae* is significant because mycoplasmas could contaminate and have unsuitable effect on the cell cultures. Rapid detection of these contaminations is so important and it could be significant role in preventing and controlling of contamination in cell cultures.

Materials and Methods: In this study, the isolation and detection of *M. pneumoniae* from 82 cell culture samples that were sent to the Mycoplasma Reference Laboratory using cell culture and PCR method were performed. M1F and M3R primers that have the ability to identify mycoplasma genus from the 16S rRNA gene were used. The P1 adhesin gene and MPF and MPR specific primers were used to initiate the PCR reaction to detect Mycoplasma pneumonia.

Results: Of 82 samples, 31(37.8%) were positive and 51 (62.2%) were detected negative performing cell culture. Whereas, out of 82 samples, 48 (58.53%) were positive and 34 (41.47%) of the samples were negative using mycoplasma genus PCR as diagnostic method. *M. pneumoniae* was not detected from 82 samples in this study.

Conclusion: The results of this study indicated that Mycoplasma pneumoniae is not a factor contributing to cell cultures in Iran. But PCR could be an alternative method instead of the culture because according to the results of this study, PCR has high accuracy, speed and it is cost-effective for detecting *M. pneumoniae*.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*, Cell culture, PCR, PPLO agar media

Received: 2017/10/23 Accepted: 2019/05/16 Available online: 2019/08/23

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Ahangaran S, Pourbakhsh S A, Abtin A, Asli E. Isolation and detection of Mycoplasma pneumoniae from cell culture by culture and PCR. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (3) :153-163

Download citation:
BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks
Send citation to:
Mendeley Zotero RefWorks

www.SID.ir

Archive of SID

Introduction

Mycoplasmas are microorganisms which lack cell walls, but they have particular sterol plasma membranes **(1,2)**. They are distinctive from other bacteria taxonomically and are in Mollicutes class **(15)**. These days, research laboratories use the cells and cell culture techniques for regenerative medicine **(3, 4)** and biotechnological productions **(1,7)**. After establishment of cell culture laboratories, contamination of cell cultures with Mycoplasmas have occurred. So, one of the problems in the cell culture is that laboratories could spread Mycoplasmas in all cell cultures, and it could promote between the other cell cultures **(5,7)**. Using unspecific methods to identify Mycoplasmas in cell cultures is not so reliable because Mycoplasmas may not have any cytopathic effect or turbidity in some culture cell lines. Whereas Mycoplasmas could contaminate the cell lines which they are used in manufacturing bioproducts such as vaccination so detecting of these microorganisms in cell lines have been so important and valuable **(5,16)**. Some of the various species of Mycoplasma which could contaminate cell cultures are *Mycoplasma hyorhinis, Acholeplasma laidlawii Mycoplasma pneumoniae (M. pneumoniae), Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale* and *Mycoplasma fermentans* **(5,12,16)**. *M. pneumoniae* is one of the small microorganisms which could live free in nature. Its size is about 125-250 nm and it grows in cell-free media not so fast. It may be necessary to incubate diphasic media for 2-3 weeks with periodic subcultures onto serum agar plates before an isolate is obtained Furthermore, it appears that the widely used Hayflick medium may not be optimal for the cultivation of all strains of *M. pneumoniae*.

Materials and Methods

Mycoplasma culture

For *M. pneumoniae* isolation, 82 cell culture samples were collected and cultured in PPLO broth media supplemented. All these samples were analyzed by culture and polymerase chain reaction (PCR) to detect *M. pneumoniae*. Overall, 82 samples were transferred to *Mycoplasma* reference laboratory on ice packs. Primarily, the isolated samples were passaged and filtered in fresh PPLO broth then inoculated on PPLO agar medium (BBL, Becton Dickinson and company, Cockeyville, Sparks, MD, USA). Both the broth and agar cultures were incubated at 37 °C in 50% Co_2 and 98% humidity (18,20).

DNA Extraction and PCR.

In this study we used a previously described method, with some modifications, for the extraction of DNA by Kojima et al. **(18)**. From each of cell culture samples, 0.5 mL was transferred to Eppendorf tube and centrifuged for 15 min at 13000 rpm. The supernatant fluid was discarded, and the lysis buffer was added to the tube and incubated for at least 4 hours at 56ºC. After that, phenol, phenol, chloroform (1:1) and chloroform were added to the tube individually and respectively and mixed them. Then in each step the tubes were centrifuged at 13000 rpm for 15 min and aqueous layer (top layer) was carefully transferred into a new tube for the following steps. Eventually sodium acetate and ethanol (ETOH) were added in the tubes and mixed well. The tubes were then frizzed in -20ºC for 20 minute and centrifuged for 15 min at 13000 rpm. Finally, 200 µL of 70% ETOH was added and the tubes were centrifuged for 5 min at 13000 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was dried after which 50 µL of distilled water was added to the tubes.

The PCR detection of Mycoplasma genus was performed **(18)**, after that each sample were positive in genus *Mycoplasma* PCR, were analyzed by the PCR detection of *M. pneumoniae* in 543bp fragment by using of MPF and MPR primers which obtained from *P1 adhesin* gene **(10)**.

Results

Out of the 82 cell cultures samples, 31(37.8%) were positive for Mycoplasma culture, and showing typical Mycoplasma colonies grown on PPLO agar. In addition, 48 (58.5%) samples had positive PCR results for Mycoplasma genus (Figure 1) among which no *M. pneumoniae* was found (Figure 2) (Tables 1 and 2).

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. Primers for detection of *Mycoplasma* in genus PCR

M1F	**5´-GCTGCGGTGAATACGTTCT -3´**
M3R	5´-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3´

Table 2. Primers for detection of *M. pneumoniae in PCR*

MPF	**5'- CAAGCCAAACACGAGCTCCGGCC -3'**
PR	5'- CAGTGTCAGCTGTTTGTCCTTCCCC -3'

Table 3. Consequences of culture and PCR surveys for detecting of *Mycoplasma* genus

Culture	PCR	Number
Positive	**Positive**	28
Negative	**Negative**	31
Positive	**Negative**	3
Negative	**Positive**	20
Total		82

Tablae 4. Consequences of culture and PCR surveys for detecting of *M. pneumoniae*

Method	Positive	Negative	Total
Culture	**31**(٪**37**/**8**)	**51**(٪**62**/**2**)	**82**
Genus of *Mycoplasma* PCR	**48**(٪**85**/**5**)	**34**(٪**41**/**5**)	**82**
***M. pneumoniae* PCR**	**0**(٪**0**)	**82**(٪**100**)	**82**

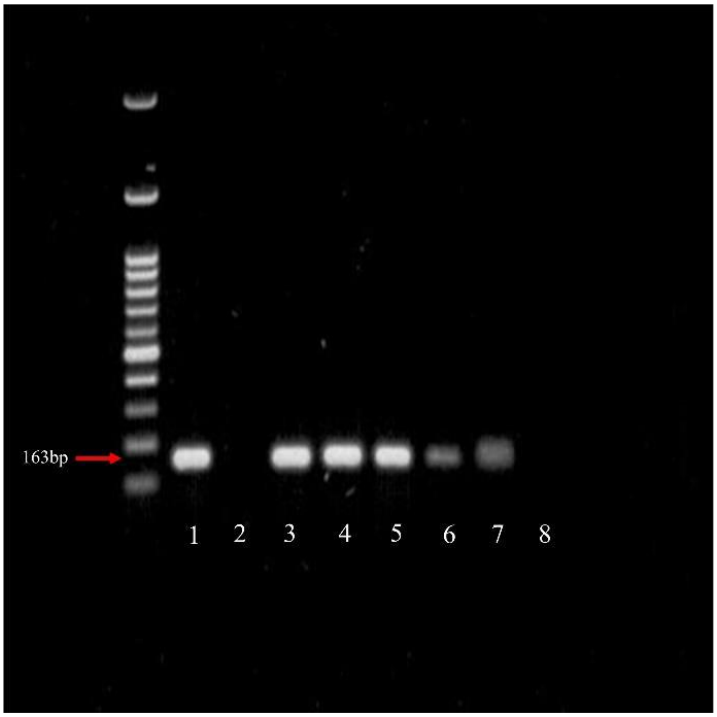


Figure 1. PCR (MPCR) for detecting of *Mycoplasma* genus: Analysis of PCR electrophoresis in %1 gel agarose. M: Marker (100bp DNA ladder).Lane C+(Lane1): Positive control (163bp band, *Mycoplasma* genus, NCTC 10123). Lane C-(Lane 2): Negative control (uncultured PPLO broth) and Lane 3 to 7 are the *Mycoplasma* isolates in this study.

www.SID.ir

Archive of SID

Figure2. *M. pneumonie* PCR (MPPCR): Analysis of PCR electrophoresis in %1 gel agarose. M: Marker (100bp DNA ladder).Lane C+(Lane 1): Positive control (*M. pneumoniae*).Lane C-(Lane 2): Negative control (uncultured PPLO broth) and Lane 3 to 14 are the cell culture samples which were be tested in this study.

M. pneumoniae is one of microorganisms which could contaminate of the cell cultures. Whereas cell cultures which could be used in vaccination, so detection of this pathogen from cell cultures could be important. In the present study *M. pneumoniae* was not isolated and detected from cell culture samples by using culture and PCR assay.

Robinson and coworkers in 1956 detected *Mycoplasma* in cell culture for the first time when they tried to investigate the consequences of PPLO on Hela cells **(24)**. Mycoplasmas are the contamination of the cell cultures; also, they could change cell cultures' function, growth, metabolism, morphology. Spread and extension of this microorganism among the cell cultures could damage the cell cultures, change their functions of each cell cultures and create CPE with plaque formation in them **(5,12,16)**. The present study showed that 37.8% of the culture samples were positive for presence of Mycoplasma in culture method and 58.5% of the samples were positive in PCR assay. So according to results of this study PCR method could be more reliable than the traditional methods such as culture for detecting *M. pneumoniae* in cell culture therefore PCR assay could be an alternative method for detection of *M. pneumoniae*. It is also recommended to use the novel molecular methods such as Real-Time PCR for the detection of *Mycoplasmas* in cell cultures since these methods are fast, sensitive, specific and low cost. Also, this study showed that there was no contamination of *M. pneumoniae* among the cell culture samples referred to the *Mycoplasma* Reference Laboratory of Razi Institute.

Conflict of Interest

The authors reported no conflict of interest.

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ ـ شماره ۳ ـ مرداد و شهریور ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و شناسایی آلودگی *مایکوپلاسما پنومونیه* از کشت‌های سلولی با استفاده از روش کشت و PCR

سلیمه آهنگران[۱]، سید علی پوربخش*[۱]، علیرضا آبتین[۲]، اسماعیل اصلی[۱]

۱. آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

پذیرش:۱۳۹۸/۰۳/۱۲

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۳/۳۰

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

IJMM1398;13(3): 153-163

نویسندهٔ مسئول:

سیدعلی پوربخش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.

ایمیل: poursaba@gmail.com

برای دسترسی به نسخه آنلاین با موبایل خود اسکن کنید

چکیده

زمینه و اهدف: *مایکوپلاسما پنومونیه* می‌تواند به‌عنوان یکی از گونه‌های مایکوپلاسماهای احتمالی آلوده کننده کشت‌های سلولی مطرح باشد. با توجه به اثرات نامطلوبی که آلودگی‌های مایکوپلاسمایی می‌توانند بر روی کشت‌های سلولی داشته باشند، شناسایی سریع این آلودگی‌ها حائز اهمیت است.

مواد و روش کار: در این مطالعه جداسازی و شناسایی *مایکوپلاسما پنومونیه* از ۸۲ نمونهٔ کشت سلولی ارسال شده به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما با استفاده از روش کشت وPCR انجام شد. بدین منظور از پرایمرهای M1F و M3R که قابلیت شناسائی جنس مایکوپلاسماها را از ژن *16SrRNA* دارد، استفاده گردید. سپس برای انجام واکنش PCR اختصاصی جهت شناسایی *مایکوپلاسما پنومونیه*، از ژن*P1 adhesin* و پرایمرهای اختصاصی MPF و MPR استفاده شد.

یافته‌ها: از مجموع تعداد ۸۲ نمونه جمع‌آوری شده، در ارزیابی به روش کشت تعداد (۳۷/۸٪)۳۱ نمونه با تشکیل پرگنه اختصاصی، مایکوپلاسما مثبت تشخیص داده شد و (۶۲/۲٪) ۵۱ نمونه نیز منفی بودند. همچنین از ۸۲ نمونه مذکور، (۵۸/۵۳٪) ۴۸ نمونه در ارزیابی با آزمون PCR جنس مایکوپلاسما مثبت تشخیص داده شدند و تعداد (۴۱/۴۷٪)۳۴ نمونه نیز منفی گزارش گردید. نهایتاً از ۸۲ نمونهٔ جمع آوری شده در این مطالعه، هیچ نمونه‌ای در آزمون ارزیابی با PCR گونه مایکوپلاسما پنومونیه تشخیص داده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، *مایکوپلاسما پنومونیه* عامل آلوده‌کنندهٔ کشت‌های سلولی در ایران محسوب نمی‌شود. همچنین آزمون PCR با توجه به سرعت و دقت بالای آن، می‌تواند آزمونی مناسب و مقرون به‌صرفه جهت ردیابی مایکوپلاسماهای آلوده کننده کشت سلولی باشد.

کلید واژه‌ها: *مایکوپلاسما پنومونیه*، کشت سلول، PCR، محیط آگار PPLO

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

مایکوپلاسماها کوچکترین باکتری‌های بدون دیوارهٔ سلولی بوده و در کلاس *Mollicutes* قرار دارند. آلودگی کشت‌های سلولی به وسیله مایکوپلاسماها یک مشکل بزرگ و مهم در آزمایشگاه‌های مربوطه محسوب می‌شود، زیرا می‌توانند به غلظت بالایی در کشت‌ها رسیده، بدون این که آثار قابل مشاهده‌ای از جمله ایجاد کدورت، تغییر pH و تغییر رنگ ایجاد کنند (۱-۳). این باکتری‌ها از مهمترین آلوده کننده‌های کشت سلولی محسوب می‌شوند، همچنین حضور این آلودگی‌ها در کشت‌های سلولی می‌تواند عوارض شدیدی بر روی ساختار، عملکردهای کلیدی سلول میزبان، نتایج آزمون‌های بیولوژیک و تست‌های تشخیصی انجام شده در کشت سلول داشته باشد. مشکل آلودگی مایکوپلاسمایی در حال حاضر به طور گسترده در ۱۵ تا ۸۰ درصد کشت‌های سلولی گزارش شده است (۳-۵).

اولین مایکوپلاسمای جدا شده از کشت سلولی در سال ۱۹۵۶ گزارش شد (۳). امروزه حدود ۲۰ گونه از مایکوپلاسماها گزارش شده اند که از کشت‌های سلولی جدا شده اند. گونه‌های *مایکوپلاسما آرژینین*، *مایکوپلاسما پنومونیه*، *مایکوپلاسما فرمنتنس*، *آکوله پلاسما لیدلاوی ای*، *مایکوپلاسما سالیواریوم* و *مایکوپلاسما اوراله* می‌توانند کشت‌های سلولی را آلوده کرده و بعضا می‌توان آنها را از کشت‌های سلولی جدا کرد. مایکوپلاسماها به دلیل قطر کمی که دارند به سهولت از منافذ فیلترهای ۴۵۰-۲۲۰ نانومتر که برای کشت سلولی استفاده می‌شود، عبور کرده و از آن طریق باعث آلودگی کشت‌های سلولی شوند (۳، ۶، ۷).

مایکوپلاسما پنومونیه اولین بار در سال ۱۹۴۴ توسط Eaton و همکاران شناسایی شد. مطالعات اولیه برای شناسایی آلودگی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

مایکوپلاسمایی با کشت میکروبی آغاز شد که روشی استاندارد برای تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی محسوب می‌شود (۹، ۸). آلوده شدن کشت‌های سلولی به مایکوپلاسماها به طرق مختلف مانند کشت‌های سلولی آلوده وارد شده به آزمایشگاه، پرسنل آزمایشگاه، محلول‌ها، معرف‌ها و یا سرم آلودهٔ مورد استفاده در کشت‌های سلولی، صورت می‌گیرد (۱۰-۱۲). *مایکوپلاسما پنومونیه* می‌تواند هم قسمت فوقانی و هم قسمت تحتانی دستگاه تنفسی را درگیر کند. لذا این باکتری ممکن است از طریق ذرات تولیدی در نتیجه عطسه کردن و یا سرفه کردن پرسنل الوده آزمایشگاه در محیط پراکنده شده و سبب آلوده شدن کشت‌های سلولی شوند (۲، ۳، ۱۳، ۱۴).

تحقیق و مطالعهٔ قابل توجهی برای تشخیص و بررسی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی که منجر به خسارات و زیان‌های جبران‌ناپذیری در بخش‌های مختلف تحقیقاتی، صنعتی، پزشکی و داروسازی می‌شود، در طی سال‌های ۱۹۶۰-۱۹۵۰ بررسی شده است (۱۵-۱۷).

شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی با استفاده از روش‌های کشت میکروبی، رنگ آمیزی، میکروسکوپ الکترونی، تست‌های بیوشیمیایی و ایمنولوژیکی معمولا وقت گیر بوده (چندین هفته) و با حساسیت نسبتا پایین، نیازمند امکانات و همینطور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج می‌باشند. بنابراین از آنجا که سرعت تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کنترل و پیشگیری از این موضوع نقش مهمی دارد، در سال‌های اخیر با استفاده از روش‌های مولکولی چون PCR، شناسایی جنس و گونه مایکوپلاسماهای مختلف با بهره‌گیری از پرایمرهای مناسب و اختصاصی، به تشخیص سریعتر (در کمتر از یک روز) این آلودگی‌ها با هزینه کمتر و حساسیت بیشتر کمک شایانی نموده است (۱۸، ۱۹). بر این اساس در این مطالعه شناسایی *مایکوپلاسما پنومونیه* در کشت‌های سلولی با حساسیت و ویژگی بالا توسط آزمون PCR مطالعه و ارزیابی شد. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه نحوهٔ شناسایی آلودگی‌های *مایکوپلاسما پنومونیه* در کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسمای موسسه رازی، با استفاده از روش کشت و تکنیک PCR بود.

مواد و روش کار

کشت‌های سلولی

از نظر آماری با فرض شیوع ۵٪ و سطح اطمینان ۹۵٪، با هدف یافتن حداقل ۱ نمونه مثبت، تعداد حداقل ۶۰ نمونه مورد نیاز بود که در این مطالعه تعداد ۸۲ نمونه از کشت‌های سلولی ارسالی به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما موسسه رازی در سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷، از نظر آلودگی به مایکوپلاسما با استفاده از روش‌های کشت و PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت اختصاصی مایکوپلاسما

برای کشت اختصاصی مایکوپلاسماها از PPLO آگار (pleuropneumonia-like organisms) و PPLO براث مربوط به شرکت BBL ساخت آمریکا با pH ۷/۶-۸ استفاده شده است. برای این منظور ابتدا نمونه‌هایی که در محیط PPLO براث به آزمایشگاه ارسال شده بودند، به منظور غنی سازی برای یک دوره‌ی کوتاه ۶ ساعته در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند.

پس از اتمام غنی سازی، تمامی محیط‌های PPLO براث حاوی نمونه، به منظور انجام پاساژ یک، توسط فیلترهای مخصوص سرسرنگی که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتر می‌باشند فیلتر شده و به آرامی محلول در محیط کشت دوم که PPLO براث (pH ۷/۸-۶) بود، تلقیح گردید. سپس این محیط در انکوباتور Co_2 دار قرار داده شد و ۳ تا ۵ روز تحت نظر قرار گرفت.

در صورت وجود تغییر رنگ در محیط PPLO براث و یا مشاهده کدورت که نشانه ی رشد باکتری در محیط است، این نمونه‌ها را تا چهار پاساژ به محیط PPLO براث جدید (pH ۷/۶-۸) منتقل کرده و در نهایت۰/۲ میلی لیتر از پاساژ چهارم، بر روی محیط PPLO آگار کشت داده می‌شود. این نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. محیط‌های کشت PPLO آگار هر روز با میکروسکوپ نوری از نظر رشد و تشکیل پرگنه‌های مخصوص به شکل تخم مرغ نیم رو تحت بررسی قرار گرفتند (۱۸، ۲۰، ۲۱).

استخراج DNA

برای استخراج DNA باکتری از روش شیمیایی فنل-کلروفروم و براساس پروتوکل Kojima استفاده شد (۱۸). همچنین در این مطالعه برای کنترل منفی از محیط PPLO براث و برای کنترل مثبت از سویه استاندارد *مایکوپلاسما پنومونیه* (NCTC 10119) استفاده شد.

PCR

به منظور شناسائی عمومی مایکوپلاسماها به روش PCR از پرایمرهای M1F و M3R استفاده شد. پرایمرهای فوق قادر به شناسائی و تکثیر یک قطعه اختصاصی در ناحیه محافظت شده ژن *16S rRNA* مایکوپلاسماها به طول ۱۶۳bp هستند که برای تکثیر ناحیه مذکور در گونه‌های مختلف جنس مایکوپلاسما پیشنهاد و استفاده شده است (۱۸).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. پرایمر های استفاده شده در این مطالعه برای واکنش PCR جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما

M1F	**5´-GCTGCGGTGAATACGTTCT -3´**
M3R	5´-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3´

همچنین به منظور شناسایی گونه *مایکوپلاسما پنومونیه* در روش PCR از پرایمرهایMPF وMPR استفاده گردید. پرایمرهای فوق بر اساس ژن *P1 adhesin* طراحی شده و قادر به شناسائی و تکثیر قطعه‌ای از این ژن با طول ۵۴۳ bp می‌باشند (۱۰).

جدول ۲. پرایمر های استفاده شده در این مطالعه برای واکنش PCR جهت تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه

MPF	**5'- CAAGCCAAACACGAGCTCCGGCC -3'**
MPR	5'- CAGTGTCAGCTGTTTGTCCTTCCCC -3'

شرایط PCR

بمنظور شناسایی جنس مایکوپلاسما با استفاده از روش PCR، حجم هر کدام از اجزای مخلوط برای هر نمونه شامل، ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر ۵۰x، ۲میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای M1F و M3R، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq (۱/۲۵unite)، ۲ میکرولیتر DNA و آب مقطر استریل با حجم نهایی هر نمونه ۲۵ میکرو لیتر بود. برنامه حرارتی PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل بصورت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و پلیمرازسیون نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه بود (۱۸).

بمنظور شناسایی *مایکوپلاسما پنومونیه* با استفاده از روش PCR، حجم هر کدام از اجزای مخلوط برای هر نمونه شامل، ۲/۵ میکرولیترPCR بافر ۵۰X، ۱میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای MPR وMPF ، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq(5unite)، ۱ میکرولیتر DNA و آب مقطر استریل با حجم نهایی هر نمونه ۲۵ میکرو لیتر بود. برنامه حرارتی PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل بصورت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه،۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و پلیمرازسیون نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه بود (۱۰).

محصولات PCR در کنار سایز مارکر، کنترل مثبت و منفی با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ آمیزی با SYBR Safe و در زیر نور UV بررسی شدند.

نتایج

از مجموعه ۸۲ نمونه کشت سلولی که در محیط PPLO آگار جهت رشد باکتری احتمالی و تشکیل پرگنه کشت داده شدند، تعداد ۳۱ (۳۷/۸ ٪) نمونه با تشکیل پرگنه مثبت تشخیص داده شدند و ۵۱ (۶۲/۲ ٪) نمونه نیز منفی بدند.

در آزمون PCR جنس مایکوپلاسما، از مجموع ۸۲ نمونه مورد مطالعه (۵۳/۵۸٪) ۴۸ نمونه از نظر جنس آلوده به مایکوپلاسما بوده و تعداد (۴۱/۴۷٪)۳۴ نمونه نیز منفی گزارش شد (شکل ۱).

مقایسه روش کشت با روش PCR نشان داد که تعداد ۲۸ نمونه در هر دو روش مثبت و تعداد ۳۱ نمونه نیز منفی می‌باشند. همچنین تعداد ۳ نمونه در روش کشت مثبت، در حالی که در روش PCR منفی گزارش گردیدند. از سوی دیگر تعداد ۲۰ نمونه نیز در روش PCR مثبت، در حالی که در کشت منفی بودند (جدول شماره ۳).

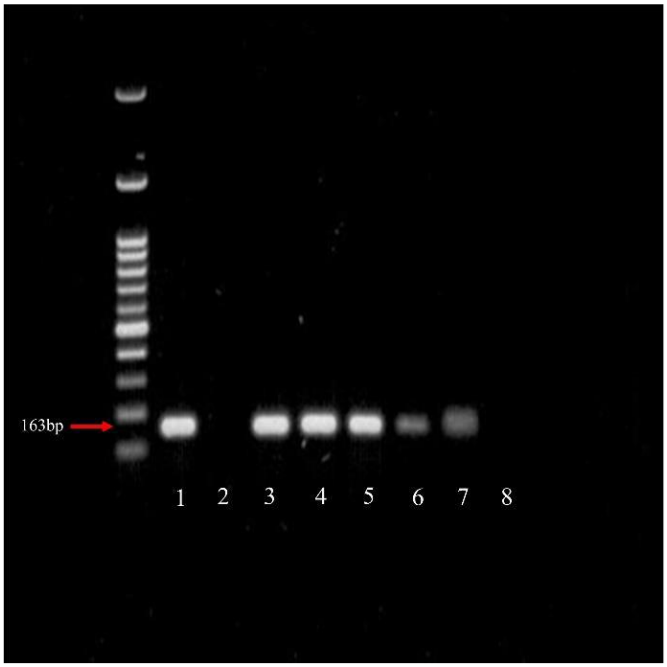
سپس ۴۸ نمونه‌ای که از نظر PCR جنس مایکوپلاسما مثبت گزارش گردیدند، با استفاده از همین روش از نظر گونه *مایکوپلاسما پنومونیه* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه مورد بررسی قرار گرفتند (تصویر شماره۲). نتایج بدست آمده بیانگر منفی بودن تمام نمونه‌ها از نظر گونه *مایکوپلاسماپنومونیه* بود (جدول شماره۴).

جدول ۳. نتایج آزمون‌های کشت و PCR جنس مایکوپلاسما

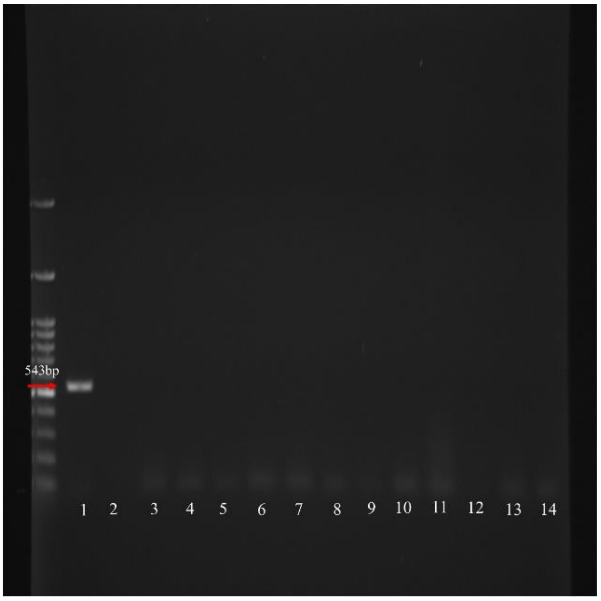
آزمون کشت	آزمون PCR	تعداد
مثبت	مثبت	۲۸
منفی	منفی	۳۱
مثبت	منفی	۳
منفی	مثبت	۲۰
مجموع		**۸۲**

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. بررسی محصول PCR جنس مایکوپلاسما بر اساس ژن 16S rRNA روی ژل آگارز ۱ درصد
مارکر (Gene Ruler 100 bp) ردیف۱:کنترل مثبت، ردیف۲: کنترل منفی، ردیف‌های۳ تا ۷ نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه



شکل ۲. بررسی محصول PCR گونه *مایکوپلاسما پنومونیه* بر اساس ژن P1 adhesin روی ژل آگارز ۱ درصد
ردیف M: مارکر(Gene Ruler 100 bp) ردیف ۱:کنترل مثبت پنومونیه ، ردیف۲ :کنترل منفی، ردیف‌های ۱۲_۳ نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه

جدول ۴. نتایج آزمون‌های کشت، PCR جنس و PCR گونه *مایکوپلاسما پنومونیه*

آزمون	مثبت (٪)	منفی (٪)	مجموع
کشت	۳۱(۳۷/۸)	۵۱(۶۲/۲)	۸۲
PCR جنس	۴۸(۸۵/۵)	۳۴(۴۱/۵)	۸۲
PCR گونه	۰(۰)	۸۲(۱۰۰)	۸۲

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این مطالعه، با توجه به اهمیت مایکوپلاسماهای انسانی آلوده کننده کشت‌های سلولی، حضور *مایکوپلاسما پنومونیه* در نمونه‌های کشت سلولی ارسالی به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما برای اولین بار در ایران با استفاده از روش کشت و PCR بررسی و مقایسه شده و نشان داده شد که هیچگونه آلودگی به *مایکوپلاسما پنومونیه* در بین کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما موسسه رازی وجود ندارد.

مایکوپلاسما پنومونیه می‌تواند به‌عنوان یکی از گونه‌های مایکوپلاسماهای احتمالی آلوده‌کننده کشت‌های سلولی مطرح باشد. همچنین اگرچه در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در کشورهای مختلف جهت شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی از جمله *مایکوپلاسما پنومونیه* انجام شده است، ولی تاکنون در زمینه شناسایی و تشخیص ملکولی *مایکوپلاسما پنومونیه* از کشت‌های سلولی در ایران مطالعهٔ منتشر شده‌ای وجود ندارد. اکثر روش‌های تشخیصی برای شناسایی مایکوپلاسماهای آلوده کننده کشت‌های سلولی، بسیار وقت گیر و پرهزینه و نیازمند افراد با تجربه به‌منظور تفسیر آنها است. از این میان این روش‌ها، روش‌هایی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی بخش‌هایی از DNA ژنوم مایکوپلاسما خصوصاً سکانس‌های ثابت و مشترک ژن 16S rRNA جهت تشخیص تمامی گونه‌های جنس مایکوپلاسما، به‌عنوان روشی سریع و ویژه گسترش یافته‌اند (۲۳، ۱۵). به کارگیری این روش اولین بار در سال ۱۹۸۹ آغاز شد و در سال‌های بعدی توسعه یافت (۲۴، ۱۸). همچنین آزمون PCR دارای حساسیت و ویژگی بالائی بوده و می‌تواند آلودگی مایکوپلاسمایی را دقیق‌تر و سریع‌تر و مقرون به صرف‌تر ردیابی کند (۲۶، ۲۵). نتایج این مطالعه نشان داد، روش کشت که به عنوان روش استاندارد طلایی در تشخیص مایکوپلاسما محسوب می‌شود، حدود ۳۷/۸٪ از مجموع نمونه کشت‌های سلولی مورد بررسی را از لحاظ حضور مایکوپلاسما مثبت ارزیابی کرد، این در حالی است که روش مولکولی PCR از مجموع نمونه‌های کشت سلولی جمع آوری شده، حدود ۵۸/۵٪ آنها را از نظر آلودگی به مایکوپلاسما مثبت تلقی نمود. همچنین تنها ۳ درصد نمونه‌های کشت سلولی ارسالی به موسسه رازی در روش کشت مثبت بوده ولی در روش PCR منفی گزارش شدند. از سوی دیگر ۲۵ درصد از نمونه‌های مذکور در کشت منفی بوده ولی در PCR مثبت گزارش شدند که حاکی از حساسیت بالای آزمون PCR در تشخیص مایکوپلاسماها است.

در چندین مطالعه با استفاده از روش کشت به جداسازی و شناسائی مایکوپلاسماها از کشت‌های سلولی پرداخته شده است. Sakhaei و همکاران در سال ۲۰۰۹ شناسائی و جداسازی مایکوپلاسماهای آلوده کننده واکسن‌های سرخک، اوریون و سرخجه (MMR) را با استفاده از روش کشت و PCR مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مطالعه آنها نشان می‌دهد که از ۵۵ نمونه واکسن جمع آوری شده، هیچ گونه آلودگی با استفاده از روش کشت و PCR شناسائی نشد (۲۷). در مطالعه ی دیگری، Timenetsky و همکاران (۲۰۰۶) به بررسی و شناسایی عوامل آلوده کننده مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی با استفاده از روش کشت و PCR پرداختند که طبق نتایج آنها از میان ۳۰۱ نمونه کشت سلولی جمع آوری شده، ۲۳٪ از کشت‌های سلولی، با استفاده از روش کشت و ۶۱/۲٪ از کشت های سلولی با استفاده از روش PCR الوده به مایکوپلاسما تشخیص داده شدند (۲۹). در مطالعه حاضر از میان ۸۲ نمونه کشت‌های سلولی مورد بررسی ۳۷/۸ درصد آنها با تشکیل کلونی از نظر کشت مایکوپلاسماها مثبت ارزیابی شدند که با نتایج Timenetsky در جداسازی و شناسایی مایکوپلاسماها با استفاده از روش کشت مطابقت دارد.

Uphoff و همکارانش در سال۱۹۹۲ در مطالعه‌ای به بررسی و شناسائی عوامل آلوده کننده مایکوپلاسمائی در ۴۹۵ کشت سلولی با استفاده از روش PCR پرداخته و ضمن ردیابی و شناسائی *مایکوپلاسما پنومونیه* در کشت‌های سلولی، اعلام کردند که *مایکوپلاسما پنومونیه* به همراه شش گونهٔ دیگر مایکوپلاسما می‌توانند در آلوده کردن کشت‌های سلولی نقش داشته باشد. در این مطالعه با توجه به نتایج بدست آمده از مجموع نمونه‌های کشت سلولی ارجاع داده شده به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما (۵۸/۵٪) نمونه‌ها از لحاظ جنس مایکوپلاسما در آزمون PCR مثبت بودند و از این تعداد هیچ نمونه مثبتی از نظر گونه *مایکوپلاسما پنومونیه* در آزمون PCR شناسایی نشد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که نمونه‌های کشت سلولی ارجاعی به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما به *مایکوپلاسما پنومونیه* آلودگی ندارند و گونه‌های دیگر آلوده کننده کشت سلولی در این آلودگی‌ها می‌توانند وجود داشته باشند (۱۲، ۹). در مطالعه‌ای که Fazli و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ۶۲ نمونه کشت سلولی انجام دادند، ۶۷٪ از نمونه‌ها از لحاظ جنس مایکوپلاسما مثبت و ۱۲٪ نمونه‌ها نیز به عنوان *مایکوپلاسما اورالله* شناسایی شدند (۲۰). مطالعه دیگری توسط Rostamizadeh و همکاران در همان سال برای شناسایی *مایکوپلاسما سالیواریوم* انجام شده است. آنها از بین ۶۲ نمونه کشت سلولی موجود، ۶۷/۷۵٪ را از لحاظ جنس مایکوپلاسما مثبت و از میان آنها ۳۵/۷۲٪ را *مایکوپلاسما سالیواریوم* گزارش کردند (۲۱). نتایج مطالعات فوق مبنی بر وجود

www.SID.ir

Archive of SID

آلودگی جنس مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی با نتایج این مطالعه مطابقت داشته ولی میزان آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی بررسی شده در این مطالعه نسبت به دو مطالعه فوق کمتر است. همچنین از نتایج مطالعات فوق می‌توان نتیجه گرفت که در ایران *مایکوپلاسما اورال* و *سالیواریوم* در مقایسه با *مایکوپلاسما پنومونیه* درصد بالایی از آلودگی‌های مایکوپلاسمایی کشت‌های سلولی را باعث می‌می شوند. Timenetsky و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند ۹۵ درصد آلودگی‌های کشت سلولی به مایکوپلاسماها مربوط به گونه‌های *مایکوپلاسما هیورینیس*، *مایکوپلاسما آرژنینی*، *مایکوپلاسما سالیواریوم*، *مایکوپلاسما فرمنتانس* و *مایکوپلاسما اورال* بوده و دو گونه *مایکوپلاسما پنومونیه* و *مایکوپلاسما پیروم* بسیار نادر در کشت‌های سلولی حضور دارند (۹). همچنین Ohno و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه‌ای به بررسی و شناسائی پنج گونهٔ مایکوپلاسمای آلوده کننده کشت‌های سلولی شامل *مایکوپلاسما آرژنینی*، *مایکوپلاسما سالیواریوم*، *مایکوپلاسما فرمنتس*، *مایکوپلاسما اورال* و *مایکوپلاسما پنومونیه* پرداختند. از ۲۰۰ نمونه کشت‌های سلولی مورد بررسی، میزان آلودگی به *مایکوپلاسما آرژنینی* ۵۹/۲٪، *مایکوپلاسما سالیواریوم* ۸/۲٪، *مایکوپلاسما فرمنتس* ۱۴/۳٪ و *مایکوپلاسما اورال* ۱۶/۷ درصد گزارش گردید، همچنین در مطالعه فوق هیچ موردی از *مایکوپلاسما پنومونیه* شناسائی نشد (۲۸، ۲۹). در مطالعه حاضر هیچ یک از نمونه‌های کشت سلولی به *مایکوپلاسما پنومونیه* آلوده نبود که با نتایج مطالعه فوق همخوانی دارد.

Stromer و همکاران (۲۰۰۸) برای شناسائی و ردیابی *مایکوپلاسما پنومونیه* در نمونه‌های کشت سلولی از روش Real-Time PCR استفاده کردند. نتایج بدست آمده در مطالعه فوق بیانگر آلوده بودن نمونه‌های مورد مطالعه به *مایکوپلاسما پنومونیه* بود. آنها اعلام کردند که این روش دارای حساسیت بسیار بالائی بوده و می‌تواند روشی مناسبی برای شناسائی عوامل آلوده کننده کشت‌های سلولی محسوب شود (۲۴). لذا پیشنهاد می‌شود برای شناسائی و ردیابی *مایکوپلاسما پنومونیه* در نمونه‌های کشت سلولی روش Real-Time PCR نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

در مطالعه حاضر واکنش PCR به منظور شناسایی و ردیابی *مایکوپلاسما پنومونیه* در کشت‌های سلولی برای اولین بار در ایران طراحی و راه‌اندازی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچگونه آلودگی به *مایکوپلاسما پنومونیه* در بین کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما موسسه رازی وجود ندارد ولی از آنجا که تعداد نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه محدود بوده و در فاصله زمانی اندکی مورد بررسی قرار گرفته بودند، پیشنهاد می‌شود مطالعه‌ای با تعداد نمونه‌های بیشتر و در بازدهٔ زمانی گسترده‌تری انجام شود تا بتوان درصد واقعی‌تری از آلودگی کشت‌های سلولی به *مایکوپلاسما پنومونیه* را مورد ارزیابی قرار داد. همچنین با توجه به این که تعداد زیادی از نمونه‌ها از نظر جنس مایکوپلاسما مثبت بوده، می‌توان با بهره‌گیری از پرایمرهای مناسب و اختصاصی نسبت به شناسایی سایرگونه‌های مایکوپلاسمایی آلوده کننده کشت‌های سلولی اقدام کرد. همچنین توصیه می‌شود برای بهبود عملکرد آزمایشگاه‌های کشت سلولی، از روش‌های نوین مولکولی نظیر PCR و Real-Time PCR که سریع، حساس، اختصاصی و کم هزینه می‌باشند، استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که هیچگونه آلودگی به *مایکوپلاسما پنومونیه* در بین کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما موسسه رازی وجود ندارد و برای بهبود عملکرد آزمایشگاه‌های کشت سلولی، روش مولکولی PCR که روشی سریع، اختصاصی و کم هزینه می‌باشد، می‌تواند جایگزین روش کشت شود.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این مطالعه از محل اعتبارات طرح شماره ۸۷۰۸۰ – ۲-۱۸-۱۸ موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تامین و پرداخت شده است. بدینوسیله از معاونت آموزش و تحقیقات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری صمیمانه آقایان دکتر منصور بنانی، دکتر عباس اشتری، سرکار خانم صدف سلطانیه و تمامی کارکنان آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج سپاسگزاری می‌شود.

Referance

1. Andrea j, Martin G, Eva L, Klaus J, Gebhard F, Reinhard B, R, Egon M . Submasseteric abscess caused by Mycoplasma salivarium Infection .J.Clin.microbiol. 2008; 46:3860-3862. [DOI:10.1128/JCM.00807-08] [PMID] [PMCID]
2. Freshney RI. Culture of animal cell, Fifth ed, pub, By Wiley-Liss. 2005. [DOI:10.1002/9780471747598]
3. Hans GD, Cord CU. Mycoplasma contamination of cell cultures, incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention.Cytotechnology.2002;39:75-90. [DOI:10.1023/A:1022913015916] [PMID] [PMCID]
4. Lincoln CK, Lundin DJ. Mycoplasma Detection and Control. United States Federation for Culture Collections Newsletter. 1990;20 (4):1-3.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures, Biologicals. 2005;33:81-85. [DOI:10.1016/j.biologicals.2005.01.004] [PMID]

6. Matsuura M, Seto K, Watanabe T, Horikawa T. Observations of delayed and immediate hypersensitivity reactions in rabbits inoculated with Mycoplasma salivarium, Mycoplasma orale and Mycoplasma hominis. In Proceedings of the V Annual Congress of the Japanese Society of Mycoplasmology. Japanese Society of Mycoplasmology, Tokyo. 1978: 58-63.

7. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62:1094-1156.

8. Harasawa, R .Nested PCR: Application to the detection of Mycoplasmas. In Razin S, Tully JG, Editors. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology. Vol.2.1995. Academic Press, London. 1995;31:710-715.

9. Thomas Prescott A, Mitchell FB, Ken BW. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of Mycoplasma pneumoniae infections. FEMS Microbiol Rev. 2008;32 :956-73. [DOI:10.1111/j.1574-6976.2008.00129.x] [PMID]

10. Chaudhary R, Sharma S, Javed S, Passi K, Dey AB, Malhotra P. Molecular detection of Mycoplasma pneumoniae by quantitative real-time PCR in patients with community acquired pneumonia. Indian J Med Res. 2013;138: 244-251.

11. Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures:a 2 years study. Biologicals. 2005;33:81-85. [DOI:10.1016/j.biologicals.2005.01.004] [PMID]

12. Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, MacLeod RA. Quentmeier. H, Steube K, Tummler M, Voges M, Wagner B, Drexler HG. Sensitivity and specificity of five different Mycoplasma detection assays. Leukemia. 1992;6: 335-341.

13. Arai S, Harasawa R,Ohno T, Takeuchi M, Hikizi K, Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, MacLeod KN, Lee I, Kato K ,Takahashi H, Okamoto I, RAF, Quentmeier H, Steube K, Tummler M, Vogas M Furudera T. Comparative studies to detect mycoplasma contamination bioindustrial materials for validating standard method. Int. Org. Mycoplasmol. Lett 1994;3:48-49.

14. Robinson LB, Wichelhausen RH, Roizman B. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia-like organisms. Science. 1956;124: 1147-1148. [DOI:10.1126/science.124.3232.1147] [PMID]

15. Kong F, James G, Gordon S, Zelynski A, Gilbert, GL. Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture, Apl. Environ. Microbiol. 2001; 67:3195-3200. [DOI:10.1128/AEM.67.7.3195-3200.2001] [PMID] [PMCID]

16. Lobo E, Chávez Y, Fernández C, Martinez S, Martinez A. Mycoplasma control in biopharmaccutical processing: Experience of Mycoplasma diagnostic incoba. 14 International congress of the international organization for Mycoplasmology (IOM), Vienna, Austria. 2002.

17. Smith A, Mowles J. Prevention and control of mycoplasma infection of cell cultures. In: Tully, J.G., Razin, S (Editors), Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology. San Diego: Academic Press. 1996: 445-51. [DOI:10.1016/B978-012583806-1/50052-3] [PMCID]

18. Kojima A, Takahashi T, Kijima M, Ogikubo Y, Nishimura Y, Nishimura S, Harasawa R, Tamura Y. Detection of Mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. Biologicals. 1997;25:365-71. [DOI:10.1006/biol.1997.0108] [PMID]

19. Rawadi G, Dussurget O. Advances in PCR-based detection of Mycoplasmas contaminating cell cultures. PCR Methods and Applications. 1995;4:199-208. [DOI:10.1101/gr.4.4.199] [PMID]

20. Fazli A, Pourbakhsh SA, Asli E, Hadadi A. Decetion of Mycoplasma 0rale contaminmination in cell culture by PCR method. Iran J Med Microbiol.2013; 7(2):7-14.

21. Rostamizadeh V, Pourbakhsh SA, Asli E, Hadadi A. Decetion salivarium contaminiation in cell culture using PCR method. Modares Journal Of Medical Sience. 2013;16(3):109-118.

22. Hopert A, Uphoff CC, Wirth M, Hauser H, Drexler HG. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in cell lines. J. Immunol. Methods.1993; 164: 91-100. [DOI:10.1016/0022-1759(93)90279-G]

23. Spaepen M, Angulo AF, Marynen P, Cassiman JJ. Detection of bacterial and Mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction, FEMS Microbiol Lett. 1992:Nov 15;78(1): 89-94. [DOI:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05547.x]

24. Stormer M, Vollmer T, Henrich B, Kleesiek K, Dreier J. Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminants and clinically important mollicute species. 2009;299:291-300. [DOI:10.1016/j.ijmm.2008.08.002] [PMID]

25. Georges R, Olivier D. Advances in PCR-based detection of Mycoplasma contamination cell cultures. Spring. 2011;4:199-208. [DOI:10.1101/gr.4.4.199] [PMID]

26. Shah hosseini MH, Gharib doust F, Allahyary E, khoram Khourshid HR, Vand Yusefi J. Detection of Mycoplasma DNA In Rheumatoid Arthritis Patients serum by PCR Journal Of Medical Council Of I.R.I. 2007; 25(2): 178 To 191.

27. Santos LM, Melshor C, Mettifogo E, Timenetsky J. Detection of Mycoplasma from cell culture by PCR and culture. 14 International congress of the international organization for myplas mology (IOM), Vienna, Austria. 2002.

28. Ohno T, Kudo T, Takeuchi M, Mizusawa H. Mycoplasma control in biopharmaccutical processing:Experiences of public cell bank in japan. 13 International congress of Iom, Fakuoka, Japan. 2000.

29. Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M. Mettifogo E. Detection of multiple Mycoplasma infection in cell cultures by PCR .Brazilian journal of medical and Biological research. 2006;39:907-914. [DOI:10.1590/S0100-879X2006000700009] [PMID]

www.SID.ir