Archive of SID

فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال دوم، شماره ۶، بهار ۱۳۸۹

تشخیص آلودگی های مایکوپلاسمایی بوسیله PCR در کشت سلول

محمدحسن شاه حسینی[۱*]، زهرا حسینی[۲]، فاطمه اخلاقی[۳] و محمد علی شکرگذار[۴]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی۲. دانشگاه آزاد اسلامی. واحد کرج گروه میکروبیولوژی ۳. موسسه رازی/ حصارک کرج ، بخش کنترل کیفی ۴. انستیتو پاستور ایران، بخش بانک سلول،

** نویسنده مسئول: محمد حسن شاه حسینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی،*

E.mail: shahhosseiny@yahoo.com

چکیده

عفونت با گونه های مایکوپلاسما می تواند منتج به ایجاد مشکلاتی در ارگانیسمهای زنده و کشتهای سلولی در شرایط آزمایشگاه گردد. این عفونتهای کمتر آشکار، اثرات مهمی بر روی ویژگیها و خصوصیات ژنتیکی و بیوشیمیایی سلولهای آلوده بر جای گذاشته و بنابراین منتج به ایجاد نتایج تجربی غیر قابل توقع و غیر قابل اطمینان شده و همینطور باعث انتقال عفونت می گردد. بنابراین، ایجاد یک پروتکل تشخیص روتین برای عفونتهای مایکوپلاسمایی، جهت بدست آوردن نتایج تحقیقاتی قابل اعتماد، و فراتر بدست آوردن فرآورده های بیولوژیک تجارتی سالم، امری ضروری و انکارناپذیر است. روشهای روتین موجود و در دسترس تشخیص مایکوپلاسماها، برای تشخیص سریع،ویژه و دقیق گونه های شایع آلوده کننده در کشتهای سلولی در *in vitro* مناسب نیستند. بدلیل این محدودیتها در روشهای متواتر، این اواخر برخی تکنولوژیهای بر پایه اسید نوکلئیک خصوصا روشهای همانند سازی اسید نوکلئیک در شرایط آزمایشگاه، و از گروه روشهای تکثیر هدف، توسعه یافته است. از این میان روشهای بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) برای شناسایی بخش هایی از DNA ژنوم مایکوپلاسما خصوصا سکانسهای ثابت و مشترک ،جهت تشخیص تمامی گونه های جنس مایکوپلاسما، بعنوان روشی سریع و ویژه گسترش یافته اند. با استفاده از پرایمرهای مخصوص جنس SHAH-GPO-3 و MGSO و گونه های استاندارد، تکنیک PCR بهینه و از جهت حساسیت و ویژگی بررسی گردید. سپس از کشتهای سلولی DNA استخراج و با PCR آزمایش شد. محصول تکثیری کلون و تعیین توالی گردید. در این مطالعه، روش PCR حساس توسعه یافته ای جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما در آلودگیهای فرآورده های بیولوژیک توسعه داده شد. ژن 16SrRNA بدلیل داشتن سکانسهای مشترک و ثابت بعنوان ژن هدف، جهت تکثیر با پرایمرهای تغییر یافته مورد استفاده واقع شد. این روش حساس توسعه داده شده، با محصولی به اندازه bp ۲۷۲، دارای حساسیتی در حد ۱۰ کپی از DNA ژنوم هدف بوده و با DNA بسیاری از میکروارگانیسمها، لاین های سلولی انسان، واکنش متقاطع نداده و از این جهت، پرایمرها دارای حساسیت و ویژگی فوق العاده بالایی هستند. نتایج بدست آمده در این مطالعه بر روی دهها لاین سلولی و واکسنهای تست شده، موید این نکته می باشد که این روش مولکولی توسعه داده شده، ابزاری موثر برای تشخیص آلودگیهای مایکوپلاسمایی در کشتهای سلولی و دیگر سیستمهای بیولوژیک است.

واژگان کلیدی: مایکوپلاسما، PCR، آلودگی، تشخیص مولکولی، کشت سلول

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مایکوپلاسماها متعلق به کلاس *Mollicutes* بوده و یکی از کوچکترین میکروارگانیسمهای زنده آزاد و توانا در خودتکثیری هستند. این باکتریها مهمترین و جدی ترین آلوده کننده های کشت سلول، فرآورده های بیولوژیک و بیوتکنولوژیک تولیدی در کشتهای سلولی، و مخرب نتایج آزمونهای بیولوژیک و تستهای تشخیصی است که در کشت سلولی انجام می شود. مشکل آلودگی در حال حاضر بطور گسترده ای در ۱۵ الی ۸۰ درصد کشتهای سلولی، بسته به لاین سلولی، آزمون مورد استفاده، و کیفیت تستهای کنترل کیفی، گزارش شده است(۲و۱). کلاس مولیکوتس دارای بیش از ۲۰۰ گونه است، اما فقط حدود ۲۰ گونه، و از این میان ۵ گونه مایکوپلاسما آرجینینی (*Mycoplasma arginini*)، اکولپلاسما لیدلاوی (*Acholplasma laidlawi*)، مایکوپلاسما هیورینیس (*M.hyorhinis*)، مایکوپلاسما ارال (*M.Orale*)و مایکوپلاسمافرمنتاس(*M.fermentans*) عامل بیش از ۹۵٪ همه آلودگیهای کشت سلولی است(۵-۳). مشخصا آلودگی کشتهای سلولی با مایکوپلاسما موجب اثرات و تغییراتی در رشد سلولی، مورفولوژی، متابولیسم آمینواسیدها و اسیدهای نوکلئیک، ویژگیهای ایمونولوژیک و بیوشیمیایی،نقص کروموزومی و نتیجتا، بدست آوردن نتایج غیر قابل اعتماد می گردد(۵و۲و۱).

منشاء اصلی آلودگی کشت های پاک، کشتهای عفونی شده با مایکوپلاسما است(۳). منبع آلودگیها (برای مثال منابع مستقیم) اغلب پرسنل آزمایشگاه (مایکوپلاسما ارال و مایکوپلاسما سالیواریوم از اروفارینکس ۲۵-۸۰ درصد افراد سالم جدا می شود؛ مایکوپلاسما فرمنتانس هم بندرت جدا می گردد) ، و سرمهای حیوانی تجارتی مورد استفاده در محیطهای کشت سلولی(مایکوپلاسما آرجینینی، اکولپلاسما لیدلاوی، مایکوپلاسما هیورینیس) است(۶و۴). مایکوپلاسماها باکتریهایی پلئومورف، با قطری حدود ۲۰۰-۵۰۰ نانومتر، و فاقد دیواره سلولی می باشند. بدلیل اندازه کوچک و ویژگی انعطافی، این باکتریها از سوراخهای فیلترهای ۴۵۰ و ۲۲۰ نانومتر که برای کشت سلول استفاده می شود بسادگی عبور کرده و از این طریق باعث آلودگی می گردند. وقتی از فیلتراسیون با فشار بالا جهت فیلتر کردن استفاده شود برخی مایکوپلاسماها از فیلترهای با تخلخل ۱۰۰ نانومتر هم عبور کرده و آلودگی ایجاد می نمایند(۷). مانند بیشتر کشتهای سلولی آلوده شده با مایکوپلاسماها، سرمهای عفونی شده بندرت از طریق بازدید بصری یا میکروسکپی، در غیاب علائم و آثار روشن عفونت (برای مثال تیرگی سرم یا محیط، تغییرات PH ، یا اثرات سیتوپاتیک روی دودمانهای سلولی) قابل تشخیص هستند. بعلاوه، سرم شرایط مساعدی برای رشد مایکوپلاسما را بدلیل فقدان سلولهای زنده و کمبود عناصر جهت رشد و همچنین داشتن اجزاء سمی و ممانعت کننده رشد، ندارد. آلودگی کم و کاهش میزان آلودگیها بوسیله فیلتراسیون، موجب عدم تشخیص مایکوپلاسما در سرمهای تجارتی می گردد.

روشهای تشخیص مایکوپلاسماها را می توان به دو دسته ۱) روشهای بر پایه کشت، و ۲) روشهای غیر کشتی، که از جهت سرعت، قابلیت اعتماد، ویژگی و حساسیت تفاوتهایی چند با هم دارند تقسیم بندی نمود(۹و۸و۴و۲و۱). روشهای برپایه کشت، تکنیکهایی وقت گیر(چندین هفته) با حساسیت نسبتا پایین و نیازمند امکانات و همینطور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج است. برخی از مایکوپلاسماها هم مانند مایکوپلاسما هیورینیس (*M.hyorhinis*) به سختی در محیط کشت رشد می کنند(۸). روشهای غیر کشتی شامل غربالگری آدنوزین فسفوریلاز (Adop)، تکنیک نشانگر کشت سلول، رنگ آمیزی DNA با رنگهای فلوروکروم، دو رگه سازی اسید نوکلئیک و واکنش زنجیره ای پلیمراز یا PCR می باشد (۱۱و۱۰و۲و۱). روشهای بیوشیمیایی مانند آدنوزین فسفوریلاز فاقد و یژگیند چرا که برخی باکتریها مانند باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، نوکلئوزید فسفوریلاز را تولید کرده و در ضمن برخی گونه های مایکوپلاسما، مانند مایکوپلاسما پنومونیه FH، مایکوپلاسما پیروم، مایکوپلاسما لیپوفیلوم در عمل چیزی تولید نمی کنند(۱۲). روشهای بر پایه تلقیح به کشتهای سلولی فاقد مایکوپلاسما و حاوی اندیکاتور هم، به دلیل سه پاساژ و تکنیک نهایی تشخیصی (برای مثال رنگ آمیزی DNA با رنگهای فلوئورسنت مانند ۴ ′ ، ۶-دی آمیدینو۲--فنیل ایندول دی هیدروکلراید یا بیس بنز ایمیدازول فلوروکروم هوخست ۳۳۲۵۸ ، یا سنجشهای بر پایه الایزا با آنتی بادیهای ویژه) وقت گیر می باشد(۱۳).

www.SID.ir

Archive of SID

روشهای بر پایه رنگ آمیزی و دو رگه سازی هم دارای حساسیت کم ونوعا ویژگی پایین هستند. بنابراین اکثریت روشهای در دسترس شناسایی آلودگیهای مایکوپلاسمایی، جهت شناسایی همزمان اکثریت وسیع گونه های مایکوپلاسمایی آلوده کننده مناسب نیستند(۱۴). جهت غلبه بر این مشکلات، روشهای تکثیر اسید نوکلئیک مانند PCR، در دهه اخیر توسعه فراوانی یافته است(۱۶و۱۵). روشهای بر پایه PCR به دلیل داشتن حساسیت، ویژگی و دقت بیشتر، روشهایی مناسب جهت تشخیص طیف وسیعی از عوامل آلوده کننده، خصوصا مایکوپلاسماها هستند(۱۷و۱۱و۱۰و۲و۱). ثابت شده است که روشهای بر پایه تکثیر، برای شناسایی برخی قطعات خاص DNA ژنوم مایکوپلاسما دارای سرعت و ویژگی است(۲۰-۱۸)، با این وجود، میزان حساسیت این تکنیک تا حد زیادی به روش استخراج DNA، ژن هدف، پرایمرهای طراحی شده، روش شناسایی محصول، نوع نمونه و بسیاری فاکتورهای دیگر بستگی دارد. پرایمرهای طراحی شده عموما جهت بخشهای مشترک ژن ۱۶S rRNA، یا بخشهای ۱۶S -۲۳S rRNA (۲۴-۲۰) و یا هدفهای دیگر طراحی شده است. سکانس ژنهای rRNA تعداد زیادی از گونه های مایکوپلاسما، تعیین ترادف شده است. مطالعات فیلوژنتیک سیستماتیک این ارگانیسمها و همینطور بررسیهای کامپیوتری مقایسه ای این ترادفهای ریبوزومی، موید بخش های بشدت ثابت و مشترک در همه انواع مایکوپلاسمایی است که جهت طراحی پرایمرهای PCR مناسب بکار می روند.

در این مطالعه توسعه یک روش بر پایه PCR جهت آشکار کردن مایکوپلاسماها در نمونه های کشت سلولی و سایر فرآورده های بیولوژیک مانند واکسنها توضیح داده می شود. اطلاعات بدست آمده در این بررسی نشان می دهد که روش حاضر، یک روش نه تنها سریع و با قابلیت تکرار بالا، بلکه تکنیکی با حساسیت و ویژگی زیاد جهت شناسایی مایکوپلاسماهای آلوده کننده می باشد.

مواد و روش ها

سویه های باکتریایی

در این مطالعه گونه های متعلق به مولیکوتس بکار رفته عبارت بودند از مایکوپلاسما پنومونیه (NCTC10119)، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما سینوویه، مایکوپلاسما گالیناروم، مایکوپلاسما گالیسپتیکوم، مایکوپلاسما اویاپنومونیه، مایکوپلاسما آگالاکتیا، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و اکول پلاسما لیدلاوی که از انستیتو رازی تهیه شدند. بعلاوه میکروارگانیسمهای استافیلوکوکوس اورئوس (*S.aureus*)، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس (*S.epidermidis*)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*S.pyogenese*)، استرپتوکوکوس پنومونیه (*S. pneumoniae*)، باسیلوس سوبتیلیس (*B. subtilis*)، و باسیلوس میکویئدس(*B.mycoides*)، گونه هایی از کورینه باکتریوم، کلاستریدیوم، انتروکوکوس فکالیس (*E. faecalis*)، اشریشیا کلی (*E.coli*)، سالمونلا، شیگلا، پروتئوس، هلیکوباکتر پیلوری (*H.pylori*)، ساکارومیسس سرویزیه (*S cerevisiae*)، آسپرژیلوس و کاندیدا آلبیکنس (*C.albicans*) که در آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه شهر قدس موجود بود و همینطور سلول های انسانی و موشی از جهت آزمون ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در PCR، مورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفتند.

کشت های سلولی

کشت های سلولی مورد بررسی در این مطالعه از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران/ایران بدست آمد. تعداد ۴۷ لاین سلولی انسانی و حیوانی از جهت آلودگی و به طریق مولکولی مورد بررسی واقع شد (جدول ۱).

استخراج DNA

DNA ژنومیک گونه های مایکوپلاسمایی از طریق کیت استخراج DNA به نام DNG-Plus (سیناژن) استخراج گردید. بطور خلاصه کشت مایکوپلاسما در مرحله انتهای فاز لگاریتمی برای ۳۰ دقیقه در g ۱۲۰۰۰سانتریفوژ شد(سویه های لیوفیلیزه، در یک میلی لیتر آب دو بار تقطیر استریل حل شد و بطور مستقیم و بدون سانتریفوژ کردن وارد پروسه استخراج گردید). رسوب سلولی حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل سوسپانسیون گردید. ۵۰۰ میکرولیتر ازمحلول DNG به لوله حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون

www.SID.ir

Archive of SID

باکتریایی اضافه وبلافاصله ورتکس گردید. لولهٔ حاوی سوسپانسیون و DNG یا Lysate، ۲۰ ثانیه شدیدا" ورتکس گردید. به Lysate، ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و سپس ۱۰ بار لوله وارونه گردید. لوله سپس به مدت ۱۰دقیقه درحرارت اتاق در ده هزار دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی به آرامی وبا وارونه کردن لوله، تخلیه شد، با استفاده از سمپلر، مایع باقیمانـــده برروی رسوب نیز برداشتـه شد. به رسوب حاصل، ۱ میلی لیتر اتانل ۷۵ درجه اضافه و۱۰مرتبه با وارونه کردن لوله به خوبی مخلوط شد. به مدت ۵ دقیقه در ده هزار دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی تخلیه و مجددا مرحله فوق تکرار شد. مایع رویی تخلیه وبا وارونه کردن لوله بر روی دستمال کاغذی، الکل های باقیمانده خارج شد. لوله حاوی رسوب به مدت ۵ دقیقه درحرارت ۶۵ درجه سانتی گراد، جهت خشک کردن DNA قرار داده شد. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، یا جهت نگهداری طولانی در تریس mM ۱۰ با pH معادل ۸ حل گردید. باتوجه به نوع روتور به کار رفته در اغلب سانتریفوژها، مقداری ازDNA، گاه تا میزان ۵۰ درصد به جدار دیواره لوله متصل باقی می ماند، لذا بهتر است تا ارتفاعی از دیواره لوله با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر حلال نهایی شسته شود. از سلولهای انسانی و موشی هم به طریق فوق DNA استخراج شد.

DNA ژنومیک باکتریهای غیر مایکوپلاسمایی از طریق جوشاندن همراه با دترجنت غیر یونی ترایتون ایکس ۱۰۰ (یک هزارم)، بدین طریق بدست آمد. یک کلنی از باکتری مورد نظر را در ۵۰ میکرولیتر از آب دو بار تقطیر استریل دیونیزه حاوی ترایتون ایکس ۱۰۰، سوسپانسیون کرده و ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای جوش، حرارت داده شد. بعد از سانتریفوژ در g × ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ میکرولیتر از مایع رویی پلت و زیر روغن، به لوله جدید منتقل گردید. از این DNA در مراحل بعدی به عنوان الگو استفاده شد. از نمونه های کشت سلول و سایر نمونه های مورد آزمایش هم به طریق فوق، DNA استخراج گردید. ۱۰ میکرولیتر از DNA بدست آمده با روش DNG، با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر راهنما در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

پرایمر و شرایط PCR

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، پرایمرهای مخصوص جنس GPO-۳ و MGSO (۲۶و۲۵و۲۱) است که پرایمر جلویی یعنیGPO-۳ آن در این مطالعه از طریق افزودن دو نوکلئوتید GT در ' ۵ آن تغییر پیدا کرد. بنابراین ترادف پرایمرهای مورد استفاده عبارتند از:

پرایمر جلویی '۳-GTGGGAGCAAAYAGGATTAGATACCCT و پرایمر عقبی Shah-GPO-3-۵'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-۳' MGSO- ۵′. ۵ میکرولیتر از DNA ژنومیک حاصل درمیکس ۲۵ میکرولیتری PCR، با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص نواحی مشترک یا همسان S ۱۶rRNA، با غلظت نهایی ۴/۰ میکرومول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی مولار)، ۵/۲ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X) (سیناژن)، ۱/۵میلی مولار$MgCl_2$ (از غلظت ۵۰mM (سیناژن))، ۰/۲میلی مولار مخلوط dNTP (۱۰ mM) (سیناژن) وبا استفاده از ۲ واحد آنزیم(۵µ/۱uL) Taq، (Taq DNA Polymerase سیناژن) و چرخه های حرارتی ۹۴ درجه سانتی گراد دودقیقه یک سیکل، ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه وطی ۴۰سیکل PCR و پلیمریزاسیون نهایی ۷ دقیقه، تکثیر یافتند. محصول PCR با سایز مورد نظر ۲۷۲ جفت باز، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، برروی ژل آگارز ۲ درصد وبا استفاده از اتیدیوم بروماید ونور UV بررسی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱. برخی از رده های سلولی مورد آزمایش

رده سلولی	مشخصات کلی سلول	کد بانک سلولی ایران
SP2/0-Ag14	Mouse Myeloma	NCBI C129
RAJI	Human Burkitts Lymphoma	NCBI C127
B95-8	Marmoset EBV transformed Lymphocytes	NCBI C110
SAOS-2	Human Osteogenic Sarcoma	NCBI C453
HFFF P16	Human Fetal Foreskin Fibroblast	NCBI C170
CT26	Mouse Colon Carcinoma	NCBI C532
STO	Mouse SIM Fetal Fibroblast	NCBI C537
LN CAP-FGC-10	Human Prostate Cancer	NCBI C439
HEPG2	Human Hepatocyte Carcinoma	NCBI C158
CCRF CEM	Human Acute Lymphoblastic Leukemia	NCBI C105
VERO	Monkey Kidney	NCBI C101
PC12	Rat Adrenal Pheochromocytoma	NCBI C189
SKBR3	Human breast Adenocarcinoma	NCBI C207
MRC5	Human Foetal Lung Fibroblast	NCBI C125
HL60	Human Promyelocytic Leukemia	NCBI C217
HEK293	Human Embryonic Kidney	NCBI C497
T47D	Human Breast Ductal Carcinoma	NCBI C203
KS62	Human CML	NCBI C122
CACO2	Human Colon Adenocarcinoma	NCBI C139
U957	Human Histiocytic Lymphoma	NCBI C130
J774A1	Mouse Monocyte macrophage	NCBI C483
PEER	Human Acute T cell Lymphoblastic leukemia	NCBI C511
F3B6	Human X mouse Heterohybridoma	NCBI C197
A431	Human Squamous Carcinoma	NCBI C204

ساخت کنترل مثبت از طریق PCR-CLONING

عمل کلون کردن قطعه ۲۷۲جفت بازی با استفاده از کیت T/A Cloning کمپانی فرمنتانس (K1214) و در وکتور pTZ57R این کیت، انجام گرفت. بطور خلاصه در ابتدا محصول PCR مورد نظر را روی ژل برده و پس از اطمینان از خالص بودن آن مستقیماً" برای عمل کلونینگ استفاده شد. سپس با استفاده از محیط C-medium این کیت، سلولهای مستعد سویه DH5-α باکتری اشریشیا کلی آماده شد. سپس عملLigation با استفاده از کیت مذکور انجام گرفت. مخلوط لایگیشن به مدت چهار ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتیگراد) انکوبه گردید. بعد طی پروتکل کیت، مرحله ترانسفورماسیون انجام گردید. کلنیهای سفید بر روی پلیت حاوی آمپی سیلین (50 µg/ml) بعلاوه مادهٔ X-Gal و IPTG انتخاب شدند. کلنی های سفید حاوی ژن مورد نظر می باشند. سپس به صورت راندوم ۱۰ عدد از کلنی‌های سفید انتخاب گردیده و کشت خطی بر روی پلیت LB agar واجد آمپی‌سیلین داده شد و مجدداً در ۳۷°C به صورت over night انکوبه گردید. پس از این مدت یک یا دو کلنی به تیوب‌های ۵/۱cc حاوی ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کرده و یک قطره روغن معدنی استریل به آن افزوده و به شدت ورتکس گردید. سپس درب تیوب‌ها با پارافیلم بسته شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند، تا غشاء باکتریها پاره و پلاسمید خارج گردد. تیوب‌ها به مدت یک دقیقه در میکروسانتریفوژ با سرعت ۱۵۰۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس از مایع رویی برای PCR استفاده گردید. PCR با مواد و مقادیر ذکر شده قبلی انجام داده شد، ومحصول بر روی ژل آگارز٪۲ مشاهده گردید. تمامی کلنی‌ها واجد قطعه مورد نظر بوده، لذا دو عدد از آن ها به نام pSHA ۲۷۲-۱ و pSHA-۲ ۲۷۲ به صورت راندوم انتخاب و با استفاده از روش لیز قلیایی از آنها پلاسمید استخراج و در مرحلهٔ بعد PCR را با استفاده از پلاسمیدهای استخراج شده انجام داده و محصول بر روی ژل آگارز ٪۵/۱ بررسی گردید. از پلاسمیدهای حاصل به عنوان کنترل مثبت و همینطور جهت تعیین توالی استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

حساسیت و ویژگی

جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده، از دو روش استفاده شد. ۱) تهیه رقت از سوسپانسیون مایکوپلاسما پنومونیه با واحد کلنی ساز (CFU) مشخص، استخراج DNA از رقتها و انجام آزمون PCR ؛ ۲) رقیق سازی پلاسمید ۱-۲۷۲ pSHA و انجام PCR بر روی محلولهای حاوی مقادیر مشخص از پلاسمید.

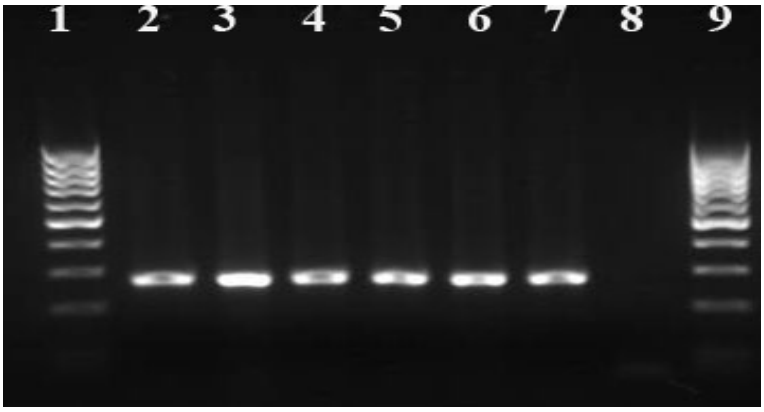
آزمون ویژگی هم با استفاده از تعداد زیادی از میکروارگانیسمها مانند استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس (*Staphylococcus epidermidis*)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenese*)، استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus pneumoniae*)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، باسیلوس میکویئدس (*Bacillus mycoides*)، کورینه باکتریوم، کلاستریدیوم، انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*)، اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)، سالمونلا، شیگلا، پروتئوس، هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) و همینطور DNA سلولهای یوکاریوت پست، رت و انسان انجام شد.

توالی یابی (Sequencing)

تعیین توالی DNA در جهت جلویی و با استفاده از روش خستم زنجیره (Di-deoxy Chain Termination) و بوسیله کمپانی ماکروژن کره انجام گردید.

نتایج و بحث

در این مطالعه سعی شد روشی مولکولی با حساسیت بالا جهت پی بردن به آلودگیهای مایکوپلاسمایی در نمونه های مختلف طراحی کنیم، لذا با تغییر دادن پرایمرهای۳ -GPO و اضافه کردن دو باز در ابتدای آن، و نزدیک کردن دمای چسبیدن پرایمر SHAH-GPO-۳ به MGSO، حساسیت و در عین حال ویژگی آن را افزایش دادیم. همینطور با افزایش دمای چسبیدن پرایمرها به سکانسهای مکمل(حدود C ۷۰°)، شرایط سختی را نیز بالا بردیم. سکانس ۱۶S rRNA انواع و اقسام گونه های مایکوپلاسمایی را ازGeneBank بدست آورده و پرایمرهای تغییر یافته را بر اساس این ترادفها و شماره های دسترسی (Accession number)، بررسی نمودیم. بنابراین با تغییر پرایمر GPO-۳ و طراحی SHAH-GPO-۳ و با استفاده از DNA های مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما سینوویه، مایکوپلاسما گالیناروم، مایکوپلاسما گالی سپتیکوم، مایکوپلاسما اویاپنومونیه، مایکوپلاسما آگالاکتیا، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و اکول پلاسما لیدلاوی، تکنیک PCR را بهینه نمودیم. با تمام مایکوپلاسماهای مورد آزمایش، جفت پرایمر مورد استفاده منتج به محصول ۲۷۲ جفت بازی گردید (شکل ۱).



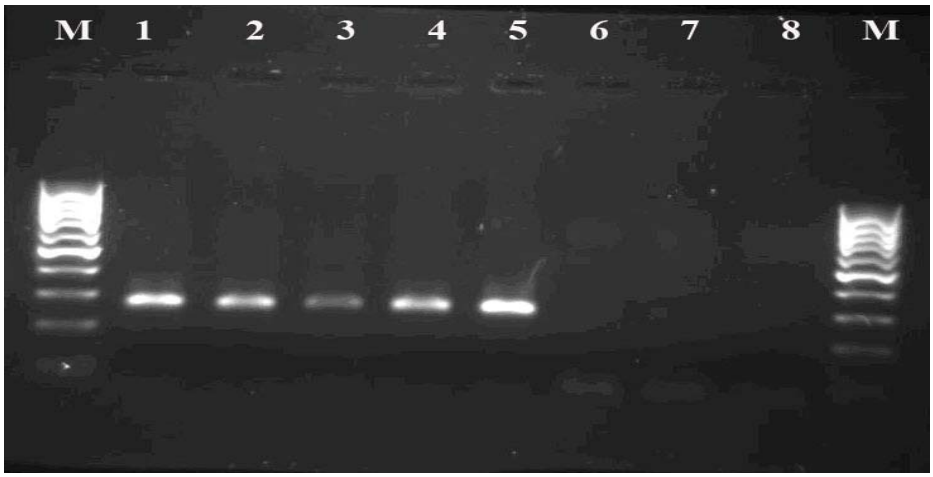
شکل۱. آگارز ژل الکتروفورز نتایج تکثیر PCR با استفاده از پرایمرهای۳ -SHAH-GPO و MGSO: ستون ۱و۹ . سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰ (فرمنتاس).، ستون۲. مایکوپلاسما آرجینینی.، ستون۳. مایکوپلاسما هیورینیس.، ستون ۴. مایکوپلاسما ارال.، ستون۵ . مایکوپلاسما فرمنتاس.، ستون۶ . اکولپلاسما لیدلاوی.، ستون۷ . مایکوپلاسما پنومونیه.، ستون ۸. کنترل منفی.(آگارز ٪۲ و بافر X۵/۰TBE).

www.SID.ir

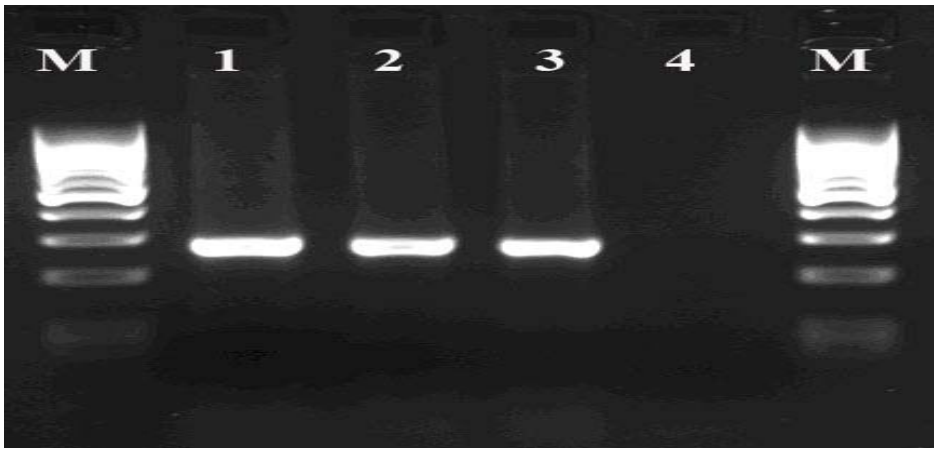
Archive of SID

مایکوپلاسما در ۴۷ رده سلولی مورد آزمایش بوسیله PCR مخصوص جنس بهینه شده جستجو شد. از این تعداد، ۲۵ لاین سلولی آلوده (٪۵۳)، از طریق تکثیر قطعه صحیح، تشخیص داده شد (شکل ۲).

جهت بررسی و تائید ویژگی سنجش PCR مخصوص گروه مایکوپلاسما، قطعه ۲۷۲ جفت بازی در پلاسمید pTZ57R و باکتری اشریشیا کلی DH5-α کلون و پلاسمیدهای pSHA ۲۷۲-۱ و pSHA ۲۷۲-۲ ساخته شد (شکل ۳). از این پلاسمید حاوی اینسرت، بعنوان کنترل مثبت و همینطور جهت تعیین ترادف استفاده گردید. ترادف حاصل با سکانسهای موجود از طریق برنامه BLAST ،مطابقت و Identity حدود صد در صد بدست آمد. بنابراین نتایج تعیین ترادف ما با سکانسهای موجود در بانک ژنی مطابقت داشت.



شکل۲. الکتروفورز نتایج تکثیر PCR تعدادی از رده های سلولی مورد آزمایش. ستونM : سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰ (فرمنتاس)،. ستون۱: کنترل مثبت،. ستون۲ الی ۵: چهار رده سلولی آلوده،. ستون ۶ و ۷ : دو رده سلولی غیر آلوده،. ستون ۸: کنترل منفی. (آگارز ٪۲ و بافر X ۵/۰ TBE).



شکل۳. نتایج PCR قطعه ۲۷۲ جفت بازی کلون شده و ساخت پلاسمیدهای pSHA ۲۷۲-۱ و pSHA ۲۷۲-۲ . ستونM : سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰ (فرمنتاس)،. ستون۱: کنترل مثبت،. ستون۲ و ۳: پلاسمیدهای بترتیب pSHA ۲۷۲-۱ و pSHA ۲۷۲-۲ ، ستون۴ : کنترل منفی (آگارز ٪۴ و بافر X ۵/۰ TBE).

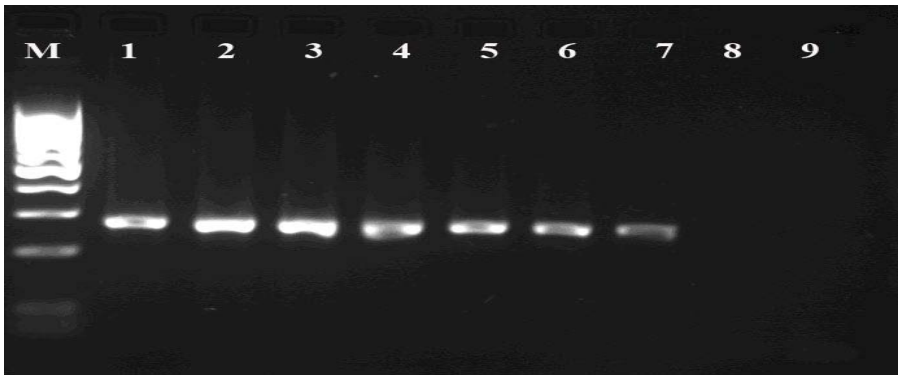
در این مطالعه سعی شد از روش استخراج DNA ساده و سریع استفاده شود لذا از روش جوشاندن به همراه یک دترجنت غیر یونی مانند Triton X۱۰۰، که حضورش در مقادیر نسبتا بالاتری از دترجنتهای یونی مانند SDS، در مرحله تکثیر قابل تحمل است، استفاده گردید. بنابراین مرحله استخراج DNA این بررسی، روشی سریع و نسبتا حساس است.

www.SID.ir

Archive of SID

جهت ارزیابی حساسیت آزمون، از پلاسمید حاوی اینسرت با تعداد مشخص استفاده شد و بدین ترتیب از طریق رقت سازی پلاسمید حاوی اینسرت، حساسیت تست در حد ۱۰ کپی در نمونه مورد آزمایش بدست آمد.

حساسیت از طریق رقیق سازی کشت مایکوپلاسما پنومونیه با واحد سازنده کلنی مشخص هم انجام شد و نتایج مشابهی(در حد پیکوگرم از DNA مایکوپلاسما پنومونیه) حاصل شد (شکل ۴).



شکل ۳. آزمون حساسیت PCR بهینه شده با استفاده از نمونه های مشخص کلنی کانت شده (CFU مشخص). ستونM : سایز مارکر ۱۰۰ bp DNA Ladder (فرمنتاس).، ستون۱: کنترل مثبت.، ستون۲ الی ۸حاوی نمونه های مشخص و بترتیب ستون ۲ (۳۱۲۵۰ CFU) .، ستون ۳(۶۲۵۰ CFU) .، ستون ۴ (۱۲۵۰ CFU) .، ستون ۵ (۲۵۰ CFU).، ستون ۶ (۵۰ CFU)، ستون ۷ (۱۰ CFU) .، ستون ۸(۲ CFU).، ستون ۹: کنترل منفی. (آگارز ٪۲ و بافر ۵/۰ X TBE).

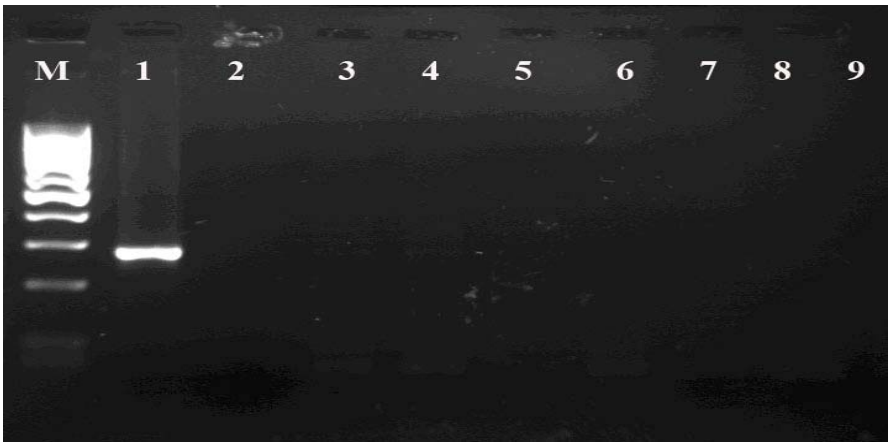
در آزمون ویژگی پرایمرهای۳ -SHAHGPO و MGSO، هیچ محصول خواسته ای (۲۷۲ bp) با DNA باکتریهای غیر مایکوپلاسمایی مانند میکروارگانیسمهای استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*) ، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس (*Staphylococcus epidermidis*)، استرپتوکوکوس پیوژنز (*Streptococcus pyogenese*)، باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*)، استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus pneumonia*) و باسیلوس میکوئیدس (*Bacillus. mycoides*)، کورینه باکتریوم، کلاستریدیوم، انتروکوکوس فکالیس (*Enterococcus faecalis*)، اشریشیا کلی (*Escherichia coli*)، سالمونلا، شیگلا، پروتئوس، هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*) و همینطور DNA انسان و موش و یوکاریوتهای پست مانند ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae*)، آسپرژیلوس، کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*)، دیده نشد (شکل ۵). در دمای چسبیدن $70^{\circ}C$، جفت پرایمر مورد بررسی یک باند اختصاصی ۲۷۲جفت باز با همه گونه های مایکوپلاسمایی مورد آزمایش و همینطور با همه گونه های مولیکوتس ایجاد نمود. بعلاوه، هیچ محصول تکثیری وقتی که این جفت پرایمر با طیف وسیعی از میکروارگانیسمهای لیست شده در قسمت روشها و همینطور با DNA رت و انسان انجام شد ایجاد ننمود.

فقط یک بخش، یعنی نوکلئوتیدهای ما بین ۱۰۲۹تا ۱۰۵۵سکانس ۱۶S rRNA مایکوپلاسماها پتانسیل و معیارهای مناسب جهت پرایمر مخصوص جنس را دارد. مطابقت این بخش با سکانس rRNA چندین میکروارگانیسم، کلروپلاستها و همینطور یوکاریوتها موید تعداد زیادی اتصال ناجور در قسمت '۵ این بخش (که مطابق انتهای '۳ پرایمر MGSO است) می باشد. اطلاعات بدست آمده تطبیق این بخش با چندین میکروارگانیسم، شامل اعضای جنس های خویشاوند و منسوب با مایکوپلاسماها، یعنی استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، باسیلوس، کلاستریدیوم و اریزیپلوتریکس تائید کننده این موضوع است که اختلافات زیادی ما بین آنها وجود دارد. همینطور تطبیق این بخش با گونه های متعدد موجود در مولیکوتس، موید هومولوژی و اختلافات کم، در حد یک یا دو نوکلئوتید، و آن هم بطور غیر متمرکز و دور از ناحیه '۳ پرایمر طراحی شده می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بنابراین اعضاء جنس مولیکوتس بوسیله کاربرد این پرایمر، تکثیر می گردند. در ضمن این تطبیق ها نشان دهنده این موضوع هم است که پرایمر بکار رفته برای جنس مایکوپلاسما، منحصر نمی باشد و اعضاء جنس اوره آپلاسما، اسپیروپلاسما واکول پلاسما نیز در استفاده از این پرایمرهای بخش ۱۶S rRNA، تکثیر می یابند. بدلیل اینکه فقط یک بخش مخصوص مایکوپلاسما تعیین هویت شد لذا الیگونوکلئوتید Shah-GPO۳ بعنوان پرایمر ' ۵، در جفت پرایمر مخصوص جنس مورد استفاده واقع شد.



شکل ۵ . نتایج الکتروفورز آزمون ویژگی تکنیک PCR بهینه شده. ستونM : سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰(فرمنتاس).، ستون۱: کنترل مثبت.، ستون۲ : DNA انسان .، ستون ۳ : DNA رت.، ستون ۴ : DNA ساکارومیسس سرویزیه.، ستون۵ : DNA اشریشیا کلی.، ستون ۶ : DNA باسیلوس سوبتیلیس.، ستون ۷ : DNA کلستریدیوم .sp .، ستون ۸ : DNA انتروکوکوس فکالیس .، ستون ۹ : کنترل منفی. (آگارز ٪۲ و بافر X ۵/۰ TBE).

مایکوپلاسماها ارگانیسمهایی غیر قابل رویت با میکروسکپهای نوری و مهمترین عوامل آلوده کننده کشتهای سلولی هستند. این عوامل آلوده کننده پنهان به طرق مختلفی همچون شناسایی تغییر رنگ محیطهای کشت، شناسایی آنتی ژنهای خاص بوسیله الایزا، روشهای بیوشیمیایی، کشت در محیطهای کشت، رنگ آمیزی با رنگهای فلوروکروم مانند رنگ هوخست ۳۳۲۵۸و DAPI، و روشهای مولکولی قابل شناسایی‌اند. عفونت مایکوپلاسمایی کشتهای سلولی موجب تغییرات بیوشیمیایی و ژنتیکی و نتیجتا تفسیر نامتناسب نتایج آزمایشها بر روی کشتهای سلولی آلوده می گردد. بنابراین، جستجوی آلودگی مایکوپلاسمایی بطور دوره ای در لابراتوارهایی که با کشت سلول سروکار دارند بایستی انجام شود (۲۸و ۲۷).

تلفیق نتایج سرولوژیک و بیوشیمیایی اغلب وسیله ای مفید جهت تعیین هویت مولیکوتها می باشد. معذالک، داده های بیوشیمیایی حاصل اغلب فاقد قدرت شناسایی بوده و همینطور مسئله واکنش متقاطع سرولوژیکی و حساسیت کم، همیشه یکی از سدهای مهم کاربرد روشهای سرولوژیک می باشد(۳۱-۲۹). مشکل تعیین هویت سرولوژیکی خصوصا در مواردی که تعداد زیادی عامل مورد شناسایی قرار می گیرد بدلایل تکنیکی تشدید می گردد. در این مطالعه سعی شده است با استفاده از روشی مولکولی و حساس، بازده تعیین هویت مایکوپلاسماهای آلوده کننده کشتهای سلولی و فرآورده های بیولوژیک افزایش یابد. نتایج بدست آمده در این مطالعه، دلالت بر این موضوع دارد که می توان از سکانسهای ثابت و مشترک ۱۶S rRNA موجود در مایکوپلاسماها، به عنوان یک هدف مناسب جهت تشخیص گونه های متعدد و آلوده کننده سرمهای حیوانی، کشتهای سلولی و فرآورده های بیولوژیک، استفاده نمود.

بدلیل اهمیت آلودگیهای کشت سلول و سایر فرآورده های بیولوژیک، داشتن یک روش سریع و حساس جهت شناسایی کارآمد آلودگیهای مایکوپلاسمایی، از

www.SID.ir

Archive of SID

اولویت بالایی برخوردار است. بطور ایده آل، این روش بایستی نه تنها قادر به شناسایی ۵ گونه تیپیک آلوده کننده(مایکوپلاسما هیورینیس، آرجینینی، ارال، فرمنتانس و اکولپلاسما لیدلاوی) و عامل بیش از ۹۸٪ آلودگیها باشد(۳۰، ۳، ۲) بلکه بایستی سایر گونه های آلوده کننده مولیکوتس ها و متعلق به اجناس مایکوپلاسما، اکولپلاسما، اوره آپلاسما و اسپیروپلاسما (که عامل باقیمانده ۲٪ آلودگی است) را شناسایی نماید. در این مطالعه سعی شده است یک سنجش PCR بر پایه پرایمرهای مخصوص گروه مایکوپلاسما و هدف ژنی ۱۶S rRNA که مقاصد بالا را مهیا کند توسعه داده شود. بر این مبنا با انتخاب سکانسهایrRNA۱۶S تعداد زیادی مایکوپلاسما و صف بندی و تجزیه و تحلیل کامپیوتری با سکانسهای دیگر پروکاریوتها، پرایمرهای Shah-GPO-۳ و MGSO انتخاب شدند. تکثیر *in vitro* بوسیله PCR و با استفاده از این جفت پرایمر، منتج به تکثیر سکانس اعضاء مولیکوت ذکر شده در بالا و عدم تکثیر هیچ نوع محصول با سایر پروکاریوتها گردید و البته در این بررسی، مناسب بودن این پرایمرها و سنجش جهت تشخیص آلودگیهای مایکوپلاسمایی در کشت سلول ثابت گردید. در عین حال نتایج سنجش PCR حاضر بوسیله تکنیک تعیین ترادف تائید گردید.

مقایسه ما بین تکنیک PCR با کشت میکروبی، روشهای رنگ آمیزی DNA با رنگهای فلوروکروم، و تکنیک هیبریدیزاسیون موید این موضوع است که PCR روشی حساس، سریع و کارآمد است. روشهای کشت میکروبی مستلزم ۱-۴ هفته وقت در آزمایشگاه می باشد. بعلاوه، می دانیم که هنوز برخی از سویه های مایکوپلاسما علی رغم پیشرفتهای زیاد در کشتهای میکروبی غیر قابل رشد ویا به سختی و زحمت زیاد (مانند *M. hyorhinis*) رشد می نمایند (۳۲). در مطالعات مشابه که از تکنیک کشت به همراه روشهای دیگر مثل روش PCR استفاده شده نشانداده شده است که تکنیک کشت دارای نتایج منفی کاذب زیادی می باشد (۲۱و۸ و۶و۳). در مورد کشتها، تفسیر نتایج هیبریدیزاسیون و رنگ آمیزی DNA بدلیل آلودگی باکتریایی غیر ممکن است.

مهمترین عیب تکنیک رنگ آمیزی DNA با رنگهای فلوروکروم، مشکل تفسیر نتایج است. این اشکال ناشی از حضور باکتریهای آلوده کننده یا اسید نوکلئیک تجزیه شده که باعث ایجاد سیگنال فلوئورسانس خارج هسته ای شده و بدین ترتیب حضور مایکوپلاسما ماسک می گردد ناشی می شود (۳۲).

تکنیک هیبریدیزاسیون(دورگه سازی) بر پایه همان اصول واکنش زنجیره ای پلیمراز(یعنی شناسایی اسید نوکلئیک ویژه) بنا نهاده شده است. اگر چه هر دو روش بطور نسبی سریع هستند اما فرقهایی هم دارند. بطور مثال گاهی تفسیر نتایج هیبریدیزاسیون بدلایلی مشکل می شود. بدین معنی که نوعا تفریق بین سیگنال های مخصوص و سیگنالهای غیر ویژه، بدلیل حضور واکنش متقاطع ما بین باکتریهای گرم مثبت مشکل می گردد (۳۳). بنابراین، نتایج مثبت هیبریدیزاسیون، فقط زمانی مورد استناد است که کشت میکروبی هیچ باکتری گرم مثبت دیگری را نشان ندهد. مزیت دیگر PCR حساسیت بالاتر آن نسبت به تکنیکهای دو رگه سازی است. حساسیت روش هیبریدیزاسیون rRNA با DNA که حدود 10^3 تا 10^4 ارگانیسم است در مواردی مانع از تشخیص مایکوپلاسما در نمونه های آلوده می گردد و بنابراین موارد فوق مبین برتریهای تکنیک PCR نسبت به روشهای کلاسیک، خصوصا در مواردی است که تعداد عامل در نمونه کم است (مانند درست قبل از تهاجم عفونت، بعد از روشهای زدودن مایکوپلاسما، یا در حضور سرم با تعداد کم عامل).

علی رغم مراقبتهای زیاد و فضاسازی مناسب جهت تکنیکهای تکثیری همچون PCR، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که نتیجتا باعث مثبت های کاذب می گردد. البته تجربه نشان داده است که با اختصاص فضاها و تجهیزات مناسب در زونهای پیش بینی شده، این امکان به صفر نزدیک می گردد. لذا کاربست کنترلهای مناسب (کنترل مثبت، منفی و یا نوعا کنترل درونی) در مراحل مختلف استخراج DNA، تکثیر و مرحله تشخیص، کمک شایانی به کاهش آلودگی و نشاندادن آن می نماید.

نتایج PCR منفی عمدتا به دو دلیل تعداد کم مایکوپلاسما در نمونه و عدم توزیع مایکوپلاسما (بدین معنی که به بخشی از سلولهای کشت، مایکوپلاسما چسبیده و بنابراین وقتی که برای اولین بار نمونه تقسیم

www.SID.ir

Archive of SID

می شود حضور مایکوپلاسما در برخی لوله ها بیشتر است) بوجود می آید.

یکی از راهها جهت افزایش حساسیت PCR، کاربرد روش تغییر یافته ای از آن بنام Nested-PCR است. دانشمندی بنام Spaepen (۳۴) با استفاده از دوجفت پرایمر جهت هدف ژنی ۱۶rRNA S، آلودگی های مایکوپلاسمایی را با حساسیت بالایی شناسایی نمود. اما راند دوم PCR در این روش ریسک آلودگی سیستم با DNA و ایجاد مثبت های کاذب را افزایش می دهد. حساسیت و قابلیت اعتماد دو شرط لازم یک تکنیک تشخیص میکروبی بر مبنای PCR می باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که شناسایی جنس مایکوپلاسما از طریق PCR در مقایسه با روشهای کلاسیک برتریهایی دارد اما این موضوع از جهت حساسیت و ویژگی هنوز قابل بحث است. بهینه نمودن سکانس پرایمر و شرایط واکنش در این بررسی موجب تشدید حساسیت، ویژگی و همینطور قابلیت تکرار و اعتماد بیشتر شده است. مشخصا ویژگی ارائه شده روش اخیر جهت تفریق مابین آلودگی مایکوپلاسمایی از دیگر عوامل آلوده کننده احتمالی شامل اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و مخمرهای جوانه زن بیشتر است.

هدف اولیه در این بررسی توسعه یک روش قابل اعتماد برای شناسایی مایکوپلاسماها در کشت سلول، سرمهای حیوانی، فرآورده های بیولوژیک و بر مبنای کاربرد تکنولوژی واکنش زنجیره ای پلیمراز بود. به همین منظور بخشهای ثابت و مشترک ژن rRNA را بعنوان هدف تکثیری، بدلیل فراوانی سکانسهای آن و همینطور ثابت و مشترک بودن آنها در بین اعضاء مولیکوتها در طول تکامل، انتخاب نمودیم. بطور معمول، آنالیز PCR آلودگیهای مایکوپلاسمایی نیازمند پرایمرهایی است که اجازه شناسایی مولیکوتها و تفریق آنها از سایر آلودگیهای غیر مایکوپلاسمایی را بدهد. بعلاوه، این رویه بایستی فارغ از واکنش متقاطع با DNA دودمانهای سلولی باشد. تکنیک ارائه شده حاضر که بصورت یک پروتکل تک مرحله ای است قادر به شناسایی حداقل ۱۰ کپی از مولکول DNA هدف در نمونه های بیولوژیک بوده و شواهد موید عدم واکنش متقاطع با DNA ژنومیک دیگر ارگانیسمها شامل انسان، موش، ساکارومیسس سرویزیه، و اشریشیا کلی است. پروتکلهای دیگر ارائه شده توسط محققین دارای حد شناسایی بین ۱الی ۱۰۰مایکوپلاسما، بسته به گونه مایکوپلاسمای آزمایش شده، هدف ژنی PCR، نوع و طراحی پرایمر، و شرایط PCR، بیان شده است (۳۸-۳۵).

بطور کلی می توان گفت روشهای کلاسیک تشخیصی، بدلایل محدودیتهای ذاتی (صرف وقت زیاد، حساسیت کم، نیاز به مهارت و تجربه زیاد و همینطور مراحل دشوار و پرزحمت) فاقد معیارهای یک روش ایده آل جهت شناسایی طیف وسیع مولیکوتها(مایکوپلاسماها) هستند. ولی روشهای مولکولی همچون روشهای تکثیر اسید نوکلئیک در شرایط آزمایشگاه، بدلیل ویژگیهای ذاتی، پتانسیل بالقوه و بالفعل، کاربرد فراوانی در تشخیص عواملی همچون مایکوپلاسماها دارند. نتایج این مطالعه بطور روشنی دلالت بر این نکته دارد که سنجش PCR بر مبنای سکانسهای ثابت و مشترک موجوددر ۱۶S rRNA، یک تکنیک مفید، ارزشمند و قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی، دقت و قابلیت اعتماد بالا جهت شناسایی آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت سلول و سایر فرآورده های بیولوژیک است. البته تحقیقات بیشتری بایستی در زمینه استخراج DNA، روشهای تغلیظ نمونه، سکانسهای هدف، روش شناسایی محصول تکثیری انجام گردد.

تقدیر و تشکر

دکتر محسن لطفی از موسسه رازی بخش مدیریت کنترل کیفی برای در اختیار گذاشتن سوشهای مایکوپلاسما، دکتر سیروس زینلی ، آقای وحید ملاکاظمی و شهرام آذری از بخش کشت سلول و بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران بدلیل در اختیار گذاشتن کشتهای سلولی و راهنماییهای علمی.

منابع:

1. Wang H, Kang F, Jelfs P, James G, and Gilbert GL. (2004). Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mullicutes strain by reverse line blot hybridization. Appli Environ Microbiol; **70**(3): 1483-1486.

www.SID.ir

Archive of SID

2. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. (2006). PCR-based detection of Mycoplasma species. J Microbiol; **44**(1): 42-49.

3. McGarrity GJ, Kotani H, Butler GH. Mycoplasmas and tissue culture cells, in: Manillof J, Mcelhaney N, Finch LR, Baseman JB (ed). (1992). Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington, D. C.; 445-454.

4. Dussurget O, Dussiox DR. (1994). Rapid and, sensitive PCR-based detection of Mycoplasmas in simulated samples of animal sera. Appli Environ Microbiol; **60**(3): 953-959.

5. Stakenborg T, Vicca J, Verhelst R, Butaya P, Maes D, Naessens A, Claeys G, Ganck CD, Haesebrouck F, Vaneechoutte M. (2005). Evaluation of tRNA gene PCR for identification of Mollicutes. J Clin Microbiol; **43**(9): 4558-4566.

6. Barile MF. (1979). Mycoplasma-tissue cell culture interactions. In: Tully GJ, Whitcomb RF (ed), the Mycoplasmas, vol.2. Academic Press, New York; 425-474.

7. Hay RJ, Macy ML, Chen TR. (1989). Mycoplasma infection of cultures cells. Nature (London); 487-488.

8. Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, Macleod R, Quentmeier H, Steube K, Tummler M, Voges M, Wagner B, Drexler HG. (1992). Sensitivity and specificity of five different Mycoplsma detection assays. Leukamia. 335-341.

9. Loens K, Uris D, Goossens H, Ieven M. (2003). Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. J Clin Microbiol; **41**: 4915-4923.

10. Eldering JA, Felton C, Veillux A, Potts BJ. (2004). Development of a PCR method for Mycoplasma testing of chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. Biological; **32**(4): 183-193.

11. Uphoff CC, Drexler HG. (2002). Comparative PCR analysis for detection of Mycoplasma infections in continuous cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim; **38**(2): 79-85.

12. Bonissol C, traincard F, Stoiljkovic B, Hosli P. (1984). Adenosine phosphorylase activity as a technique for detection of Mycoplasmas in biological media. Ann Inst Pasteur Microbiol; 135A: 63-72.

13. Jurmanova K, hajkova M, Fischer O. (1990). Detection of Mycoplasmas in cell cultures. Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr; **20**: 947-948.

14. Mardassi BB, Mohamad RB, Gueriri I, Boughattaas S, Mlik B. (2005). Duplex PCR to differentiate between Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. J Clin Microbiol; **43**: 948-958.

۱۵. شاه حسینی محمد حسن، واکنش زنجیره ای پلیمراز. چاپ اول: دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۳۸۴ : ۱-۲۵.

۱۶. شاه حسینی محمد حسن، مبانی تشخیص مولکولی. چاپ اول: دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۳۸۴.

17. Hart MK, Delgiudice RA, Korch GW. (2002). Absence of Mycoplasma contamination in the anthrax vaccine. Emerg Infect Dis; **8**(1): 94-96.

18. Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K, Waters C, Douglass P, Stallock J, Kehl S, Henrickson KJ. (2005). The pneumoplex assays, a multiplex PCR- enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, mycoplasma pneumoniae, Chlamydia(chlamydophila) pneumoniae, legionella pneumophila, legionella micdadei, and Bordetella pertussis, and its real-time counterpart. J Clin Microbiol; **43**: 565-571.

19. Kong F, James G, Gordon S, Zelynski A, Gilbert GL. (2001). Species-specific PCR for identification of common contaminant Mollicutes in cell culture. Appl Environ Microbiol; **67**: 3195-3200.

20. Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K, Kato I. (1993). Detection and tentative identification of dominant Mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. Res Microbiol; **144**: 489-493.

21. Van-kuppeveld FJ, Van-der-logt JT, Angulo AF, Van-Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, Galama JM, Melchers WJ. (1992). Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Appl Environ Microbiol; **58**: 2606-2615.

22. Rawadi G, Dussurget O. (1995). Advances in PCR-based detection of Mycoplasmas contaminating cell cultures. PCR methods Appl; **4**: 199-208.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Quirk JT, Kupinski JM, Dicioccio RA. (2001). Detection of Mycoplasma ribosomal DNA sequences in ovarian tumors by nested PCR. Gynecol Oncol; **83**: 560-562.

24. Tang J, Hu M, Lee S, Robin R. (2000). A polymerse chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture. J Microbiol Methods; **39**: 121-126.

25. Ossewaarde JM, Rieffe M, Rozenberg-Arska m, Ossenkoppele PM, Nawrocki RP, and Van Loon AM. (1992). Development and clinical evaluation of a polymerase chain reaction test for detection of Chlamydia trachomatis. J Clin Microbiol; **30**: 2122-2128.

26. Ossewaarde JM, Veris AD, Bestebroes T, and Angulo AF. (1996). Application of a Mycoplasma Group-specific PCR for monitoring decontamination of Mycoplasma-infected Chlamydia sp. Strains. Applied Environ Microbiol; **62**(2): 328-331.

27. Razin S, (1994). DNA probes and PCR in diagnosis of Mycoplasma infections. Mol. Cell Probes; **8**: 497-511.

28. Harasawa R. Nested PCR: Application to the detection of Mycoplasmas. In Razin, S. and Tully, J. G. Editors. (1995). Molecular and Diagnostic procedures in Mycoplasmology Vol.2 Academic Press, London.

29. Salih BA, Rosenbusch RF. (2001). Cross-reactive proteins among eight bovine Mycoplasmas detected by monoclonal antibodies. Comp. Immunol. Microbial; **24**: 103-111.

30. Rodriguez F, Fernandez A, Ball H J.(1997). Detection of Mycoplasma mycoides subspecies mycoides by growth-inhibition using monoclonal antibodies. Res. Vet. Sci. ; **63**: 91-92.

31. Been-Abdelmoumen B, Roy RS. (1995). Antigenic relatedness between seven avian Mycoplasma species as recovered by western blot analysis. Avian Dis. **39**: 250-262.

32. Bolske G. (1988). Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg, **269**: 331-340.

33. Johansson KE, Johansson I, Gobel UB. (1990). Evaluation of different hybridization procedures for the detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. Mol. Cell. Probes.; **4**: 33-42.

34. Spaepen M, Angulo AF, Marynen P, Cassiman JJ. (1992). Detection of bacterial and Mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. FEMS Microbiol. Lett.; **99**: 89-94.

35. Buck GE, OHara LC, Summersgill JT. (1992). Rapid sensitive detection of Mycoplasma pneumoniae in simulated clinical specimens by DNA amplification. J. Clin. Microbiol.; **30**: 3280-3283.

36. Grau O, Kovacic R, Griffais R, Montagnier L. (1993). Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of Mycoplasma pirum. FEMS Microbiol. Lett.; **106**: 327-334.

37. Kai M, Kamiya S, Yabe H, Takakura I, Shiozawa K, Ozawa A. (1993). Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples by the polymerase chain reaction. J. Med. Microbiol.; **38**: 166-170.

38. Luneberg E, Jensen JS, Frosch M. (1993). Detection of Mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction and non-radioactive hybridization in microtiter plates. J. Clin. Microbiol.; **31**:1088-1094.

www.SID.ir