مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره نهم، پاییز ۱۳۹۱
Archive of SID

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

مقایسه روش‌های مختلف (میکروبی، آنزیمی و مولکولی) تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی در رده های سلولی انسانی و حیوانی ذخیره شده در بانک سلولی انستیتو پاستور ایران

وحید ملا کاظمی ها*[۱]،رضا مهدیان[۲]، آرش معمارنژادیان [۳]، محمد علی شکر گزار[۴] ، حمیدرضامهاجرانی[۵] امیر امان زاده[۶] ، شهرام آذری[۷]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد ،گروه میکروبیولوژی-دانشکده علوم-دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات اراک،اراک،ایران
[۲]استاد یار گروه پزشکی مولکولی،بخش بیوتکنولوژی، انستیتوپاستورایران،تهران،ایران
[۳]استادیار گروه ویروس شناسی، بخش هپاتیت و ایدز ،انستیتوپاستورایران،تهران،ایران
[۴]دانشیار و رئیس بخش بانک سلولی،انستیتو پاستور ایران،تهران-ایران
[۵] استادیارومدیرگروه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات اراک،اراک-ایران
[۶]دانشجوی دکترایPhD بخش بانک سلولی،انستیتو پاستور ایران،تهران-ایران
[۷] دانشجوی دکترایPhD بخش بانک سلولی،انستیتو پاستور ایران،تهران-ایران

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی مایکوپلاسما در کشت سلول از مشکلات جدی در تولید فرآورده‌های بیولوژیک محسوب می‌شود. هدف ما در این پژوهش انتخاب بهترین روش استاندارد به عنوان روشی سریع با حساسیت، اختصاصیت و دقت بالا برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کشت های سلولی بانک سلولی ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش۴۰ رده‌ی سلولی مشکوک به آلودگی مایکوپلاسما توسط سه روش کشت میکروبی، آنزیمی و مولکولی مورد مطالعه واقع گردیدند. ارزیابی آنزیمی به کمک کیت mycoalert انجام شد و در روش مولکولی از پرایمر یونیورسال طراحی شده بر مبنای سکانس‌های ثابت و مشترک موجود در 16SrRNA ریبوزومی استفاده گردید.

یافته‌ها: درصد آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی با روش‌های مولکولی، آنزیمی و میکروبی به ترتیب با ۵۷/۵٪ و ۵۲/۵٪ و ۴۰٪ استحصال گردید . نتایج حکایت از تایید حساسیت، ویژگی و صحت (دقت) بالای ارزیابی مولکولی واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در مقایسه با دو روش آنزیمی و کشت میکروبی دارد.

نتیجه‌گیری: سنجش PCR بر مبنای سکانس‌های ثابت و مشترک موجود در 16SrRNA ریبوزومی، تکنیکی ارزشمند، مفید و قابل اعتماد با حساسیت، اختصاصیت و دقت بالا جهت شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی و سایر فرآورده‌های بیولوژیک می باشد. تکنیک آنزیمی mycoalert با توجه به حساسیت، ویژگی و سرعت بالای آن در تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی (کمتر از ۲۰ دقیقه) بعد از PCR ، می‌تواند جایگزین روش های کشت میکروبی و رنگ آمیزی DNA فلوئوروکروم گردد.

کلمات کلیدی: کشت سلولی، آلودگی مایکوپلاسمایی، رده‌های سلولی انسانی- حیوانی

مقدمه

برای اولین بار در سال ۱۹۵۶ میلادی، آقای رابینسون و همکارانش (۴۰) مشاهده کردند که کشت‌های سلولی ایشان به مایکوپلاسما آلوده گردیده است و در دهه ۱۹۶۰ میلادی، مایکوپلاسما به عنوان یکی از مهم ترین و شایع‌ترین آلوده‌کنندگان اصلی کشت های سلولی محسوب و معرفی گردید (۶۴،۶۲،۴۲،۳۸،۲۹،۲) .مایکوپلاسما به عنوان کوچکترین میکروارگانیسم‌های زنده با اندازه‌ای در حدود ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر است. این میکروارگانیسم‌های پلی‌مورف دیواره سلولی ندارند و دارای تکثیر خودبخودی و با زمان تکثیر سلولی ۹-۱ ساعت و سایز ژنوتیک ۶۰۰ تا ۲۲۰۰ کیلوباز می‌باشند و ضمناً

ادرس نویسنده مسئول: گروه میکروبیولوژی-دانشکده علوم پایه-دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات اراک،اراک-ایران
Email:vmkazemi@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۳/۰۸
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۶/۲۹

www.SID.ir

Archive of SID

مایکوپلاسماها جزء کلاس مولیکوت‌ها و رده‌ی تنریکوت‌ها طبقه‌بندی می شوند،که از طریق کاهش ژنومیک و تکامل برگشت پذیر به احتمال یقین از لاکتوباسیلوس‌ها، کلوستریدیوم ها و استرپتوکوک‌ها مشتق شده‌اند. خانواده مولیکوت‌ها دارای بیش از ۲۰۰ گونه می‌باشند که در ۸ جنس طبقه‌بندی گردیده‌اند و برخی از آن ها ساپروفیت و دارای زندگی کومانسالی می‌باشند که در انسان، گیاه، حیوان،حشرات و محیط زیست و غیره وجود دارند. از مایکوپلاسماهای پاتوژن مهم مجاری تنفسی و مجاری تناسلی انسانی می‌توان به مایکوپلاسماپنومونیه، مایکوپلاسماژنیتالیوم، مایکوپلاسماهومینیس و اوره‌آ پلاسما اوره‌آ آلیتیکوم اشاره کرد (۶۱،۶۰،۳۷،۱۶،۳). حضور مایکوپلاسما می‌تواند رشد سلول‌ها، مورفولوژی، ویژگی‌ها و خصوصیات بیوشیمیایی، ایمنولوژیکی ، ژنتیکی، متابولیسم و فیزیولوژی سلول‌ها را تحت تأثیر قرار بدهد. بنابراین تفسیر نتایج آزمایشات بیولوژیک که به طبع آن کیفیت محصولات و فرآورده‌های بیوداروییی به خطر می‌افتد، که در نتیجه باعث از دست رفتن وقت، زمان، مواد و محصولات تولیدی دارویی و بیولوژیک خواهد شد. به همین خاطر فارماکوپه اروپا و انجمن دارویی فدرال آمریکا (FDA) اکیداً آزمایشات تشخیصی مایکوپلاسما را به منظور افزایش کیفیت، سلامتی و ایمنی محصولات بیولوژیک و بیوداروییی توصیه کرده است (۵۶،۵۵،۱۴،۱۳،۱۲،۱۰،۶). بررسی‌ها نشان می‌دهد که ۵ تا ۸۷٪ درصد از رده‌های سلولی به مایکوپلاسماها آلوده هستند که از میان بیش از ۲۰۰ گونه مایکوپلاسماها، ۲۰ گونه از آن ها (مولیکوت‌ها) که از کشت های سلولی آلوده جدا گردیده اند، که از این میان، دست‌کم هشت گونه از مایکوپلاسماها شامل: *مایکوپلاسما آرژی‌نینی، مایکوپلاسما فرمنتنس، مایکوپلاسما اورال، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما هومینیس، مایکوپلاسما سالیواریوم، مایکوپلاسما پیروم و اکوله پلاسما لایدلاویی* مسئول بیش از ۹۵٪ موارد آلودگی رده های سلولی را تشکیل می دهند (۵۱،۴۸،۲۷،۱۷) . منابع اصلی آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی عبارتند از: پرسنل آزمایشگاهی، سرم و محیط‌های کشت سلولی آلوده، مواد مصرفی، معرف ها، تجهیزات آزمایشگاهی و سلول‌هایی که قبلاً با مایکوپلاسما آلوده شده‌اند. در ضمن مولیکوت ها می توانند در کشت های سلولی حضور داشته باشند، بدون اینکه تغییراتی قابل مشاهده‌ای از بابت کدورت یا تغییر در رنگ و pH محیط کشت سلولی داشته باشند. آن ها به خاطر اینکه فاقد دیواره سلولی هستند به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، دو آنتی‌بیوتیک خیلی مهم که معمولاً در محیط های کشت روتین سلولی استفاده می‌شود، مقاوم هستند و مایکوپلاسماها می‌توانند خیلی به آسانی کشت‌های سلولی را آلوده نمایند و توسط میکروسکوپ‌های معمولی نیز قابل مشاهده و تشخیص نمی‌باشند، قابلیت انعطاف‌پذیری، کوچک بودن و پلی‌مورف بودن آن ها به مایکوپلاسماها اجازه می‌دهند که به راحتی از فیلترهای ضدباکتریایی با قطر ۰/۴۵ تا ۰/۲۲ میکرومتر عبور نمایند (۵۴،۵۰،۴۸،۳۱،۱۹،۱۱،۸). برای سال‌های متمادی است که تکنیک‌ها و روش‌های متعددی برای شناسایی و تشخیص مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی توسعه پیدا کرده اند که این روش‌ها شامل:

۱- آزمایش مستقیم که شامل کشت میکروبی ۲- آزمایش‌های غیرمستقیم که شامل روش های غیرکشت که این روش‌ها از جهت سرعت عمل، قابلیت اعتماد و اطمینان بخشی، حساسیت، اختصاصیت، صحت و اقتصادی بودن روش مورد آزمون، تفاوت‌ها و اختلافاتی با هم دارند (۵۸،۴۵،۴۱،۳۹،۳۵،۲۳،۲۱،۱۵).

روش‌های بر پایه کشت نسبتاً وقت‌گیر (چند روز تا چندین هفته) با حساسیت نسبتاً پائین و نیازمند امکانات و همین طور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج است و نتایج منفی کاذب نسبتاً زیاد به چشم می‌خورد، به خاطر اینکه برخی از گونه‌های پرنیاز مایکوپلاسماها نظیر *مایکوپلاسما هیورینیس* و غیره به سختی در محیط های کشت میکروبی رشد می‌کنند. روش‌های غیرکشت شامل: غربالگری آدنوزین فسفوریلاز (Adop)، تکنیک نشانگر کشت سلولی، رنگ‌آمیزی DNA فلوئوروکروم، رنگ‌آمیزی بافت شناسی، میکروسکوپ الکترونی، روش‌های بیوشیمیایی، روش‌های ایمنولوژیکی، روش های DNA-DNA هیبریداسیون و DNA-RNA هیبریداسیون و PCR تک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای (Nested PCR)، PCR-ELISA، PCR اختصاصی جنس و گونه مایکوپلاسما با پرایمرهای یونیورسال و اختصاصی و مولتیپلکس طراحی شده و Real time PCR و غیره می‌باشند (۶۵،۵۷،۴۶،۳۹،۲۴،۲۲،۲۱،۲۰،۱۸،۱۶،۱۵،۵،۴). در این مقاله پژوهشی از روش کشت میکروبی به عنوان استاندارد طلایی

www.SID.ir

Archive of SID

(Gold standard) به همراه روش‌های آنزیمی® mycoalert mycoplasma detection kit شرکت Lonza و روش مولکولی PCR با پرایمرهای یونیورسال (عمومی) طراحی شده برای ارزیابی و سنجش آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی بانک سلولی انستیتوپاستور ایران به منظور اهداف کاربردی مشخص شده در زیر اقدام گردیده است:

۱- مقایسه حساسیت، اختصاصیت، صحت و سرعت عمل تشخیصی روش‌های مختلف تشخیصی در رده های سلولی آلوده به مایکوپلاسما.

۲- انتخاب بهترین روش به عنوان روش استاندارد و سریع و دقیق با حساسیت و اختصاصیت بالا در بخش بانک سلولی انستیتوپاستور ایران.

مواد و روش‌ها

الف)کشت رده های سلولی:

مطابق جدول ۴۰،۱ رده سلولی حیوانی و انسانی مختلف از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت کاملا تصادفی (Random) برای ارزیابی و آنالیز سه روش تشخیصی میکروبی، آنزیمی و مولکولی PCR مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفتند. رده های سلولی مورد نظر به منظور رشد و تکثیر سلولی در دمای اتمسفر و مرطوب حاوی ۵٪ گاز CO2 و رطوبت ۸۸٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. محیط های کشت سلولی با ۲۰٪-۱۰٪ مکمل غذایی FBS (سرم جنین گاوی) تلقیح گردیدند. در ضمن فاکتور های رشد وابسته به رده های سلولی مورد نظر، فاکتور های اختصاصی رشد سلولی و یا محیط های کشت سلولی اختصاصی رده های سلولی مورد نظر مطابق با دستور العمل مربوط افزوده گردیدند. البته ناگفته نماند که همه مکمل های غذایی رشد سلولی از جمله سرم های تجاری (FBS)، محیط های کشت سلولی، محلول های شستشو PBS، تریپسین و سایر مواد مصرفی به کار رفته از بابت عدم آلودگی مایکوپلاسمایی و منفی بودن مورد تائید قرار گرفتند. ضمنا برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی، رده های سلولی موردنظر حداقل برای مدت یک هفته، بعداز هاروست کردن در محیط کشت سلولی قرار گرفته و کشت های سلولی حداقل برای مدت سه روز نباید تعویض محیط گردند و نمی بایستی در طول این مدت آنتی بیوتیکی به محیط های کشت سلولی اضافه شود (۹).

ب)DNA سویه های مختلف *مولیکوت ها* (*مایکو پلاسما ها*)و باکتری های مورد نیاز به عنوان نمونه های کنترل مثبت و کنترل منفی جهت آزمون PCR اختصاصی جنس مایکو پلاسما

DNA سویه های مختلف مولیکوت ها (مایکوپلاسما ها) و باکتری های مختلف از کلکسیون های معتبر ATCC و NCTC به نام های *اوره آپلاسما آوره آلیتیکوم* (NCTC 10177T)، *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* (NCTC 10195)، *مایکوپلاسما سالیواریوم* (NCTC10113)، *مایکوپلاسماپنومونیه* (NCTC 10119)، آکوله *پلاسما لایدلاویی* (ATCC 23206)، *مایکوپلاسما اورال*(ATCC 23714)، *مایکوپلاسما هیورینیس* (ATCC 17981)، *مایکوپلاسما فرمنتنس* (ATCC 19989)، *مایکوپلاسما هومینیس* (ATCC 23114)، *مایکوپلاسماآرژینینی* (ATCC 23838)و *مایکوپلاسما پیروم* (NCTC 11702) به عنوان نمونه های کنترل مثبت جهت آزمون PCR اختصاصی جنس *مایکوپلاسما* و DNA سویه های مختلف باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به نام های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، پروتئوس میرابیلیس (ATCC 49565)، *باسیلوس سوبتیلیس* (ATCC 6633)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC 49189) به عنوان نمونه های کنترل منفی جهت اثبات و نشان دادن عدم تداخل واکنش با پرایمر های یونیور سال اختصاصی جنس مایکوپلاسما جهت آزمون PCR مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفتند.

ج)شناسایی آلودگی رده های سلولی به مایکوپلاسما به روش کشت میکروبی

برای انجام کشت میکروبی از محیط مشکوک به آلودگی مایکوپلاسمایی ابتدا ۱ الی ۲ میلی‌لیتر نمونه کشت سلولی خوب رشد کرده و رنگ محیط را کاملاً زرد نموده (ترجیحاً بهتر است که هم از سوپ سلولی به انضمام خود رده‌ی سلولی مورد نظر مشکوک به آلودگی، برداشته شود) به محیط اختصاصی PPLO براث (حاوی گلوکز و آرژی‌نین) اضافه شد و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور Co_2دار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط PPLO براث به خوبی به هم زده شد تا یک کدورت یکنواختی ایجاد شود. بعد به اندازه ۱ میلی‌لیتر از محیط PPLO براث داخل لوله‌های اپندورف، ریخته و به مدت

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. در مرحله بعد محیط رویی خالی شد و از رسوب حاصله در ته لوله اپندورف به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشت و در محیط کشت جامدمایکوپلاسما، PPLO آگار (حاوی گلوکز و آرژی‌نین) بدون پخش کردن، قرار داده شد. سپس درب پلیت PPLO آگار با پارافین یا چسب به منظور جلوگیری از آلودگی و خشک شدن در معرض هوا، خوب چسبانده شد و در انکوباتور Co_2دار به مدت ۳ الی ۴ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد و هر ۲ الی ۳ روز در زیر میکروسکوپ نوری، سطح محیط جهت دیدن کلنی های تخم مرغی شکل یا غیرتیپیک مایکوپلاسما (شکل ۱) مورد بررسی قرار گرفت (۱۴،۱۲).

د) شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی از طریق روش آنزیمی کیت mycoalert ® mycoplasma detection kit شرکت Lonza

روش آنزیمی ®mycoalert، یک تست انتخابی بیوشیمیایی است که میزان فعالیت‌های مشخص و معین آنزیم‌های مایکوپلاسما به نام استات‌کینازها و کاربامات کینازها را نشان می دهد. حضور این آنزیم‌های ویژه مایکوپلاسمایی، به عنوان یک روش سریع غربال گری برای تشخیص حساس آلودگی مایکوپلاسمایی را در نمونه رده سلولی موردنظر فراهم می آورند. زمانی که مایکوپلاسماهای زنده لیز می شوند، این آنزیم‌ها قادرند با واکنش با سوبستراهای فسفات کاربامویل یا فسفات استیل، آدنوزین دی‌فسفات (ADP) را به ATP (آدنوزین تری فسفات) کاتالیزوتبدیل نمایند (۳۲،۲۶).

با اندازه‌گیری میزان ATP تولید شده در هر نمونه قبل و بعد از اضافه کردن سوبسترای ®mycoalert، که این نسبت($\text{Ratio}\frac{B}{A}$) به عنوان اندیکاتوری است که حضور یا عدم حضور مایکوپلاسما را در کشت های سلولی مورد نظر را به ما نشان می‌دهد. اگر این آنزیم ها حضور نداشته باشد خوانش دوم نسبت به خوانش اول، هیچ افزایشی را نشان نخواهد داد که نسبت $\text{Ratio}\frac{B}{A}$ کوچکتر از عدد ۱ را نشان می‌دهد، که حاکی از عدم آلودگی رده‌ی سلولی مورد نظر می‌باشد. در زمانی که آنزیم‌های مایکوپلاسمایی با سوبستراهای ویژه در کیت ®mycoalert واکنش دهند، منجر به افزایش سطح ATP تولیدی خواهد شد، که این افزایش ATP با استفاده از واکنش بیولومینسانس ذیل توسط دستگاه لومینومتر شناسایی خواهد شد (که نسبت $\text{Ratio}\frac{B}{A}$ بزرگتر از عدد ۱ را نشان خواهد داد که حاکی از آلودگی رده‌ی سلولی مورد نظر به مایکوپلاسما می‌باشد.) که خلاصه مکانیسم واکنش به صورت ذیل می باشد:

$$+ O_2 + mg^{2+} + \text{لوسیفرین ATP} +$$

$$\text{لوسیفراز وکمپلکس اکسی لوسیفرین} + CO_2 + PPi + AMP + Light +$$

که شدت نور تابش شده (ساطع شده) به صورت خطی با میزان غلظت ATP تولید یا آزاد شده ارتباط دارد که توسط دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری می‌شود و ضمناً کل مراحل این واکنش می‌بایستی در شرایط دمایی آزمایشگاه (۲۲-۱۸ درجه سانتی گراد) انجام گیرد که دمای اپتیم (مناسب) برای فعالیت لوسیفراز می‌باشد.

مراحل انجام واکنش به ترتیب ذیل می‌باشد:

۱- ابتدا ۲ میلی‌لیتر از کشت سلولی یا سوپرناتانت سلولی به لوله سانتریفوژ منتقل شده، با دور RPM ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد.

۲- ۱۰۰ ماکرولیتر از سوپرناتانت سانتریفوژ شده به کووت لومینومتر منتقل گردید.

۳- زمان برنامه خوانش دستگاه لومینومتر را بر روی ۱ ثانیه تنظیم شد.

۴- ۱۰۰ ماکرولیتر معرف ®mycoalert (Reagent)، به هر نمونه اضافه و گرفته شد.

۵- بعد از ۵ دقیقه، خوانش اول در عرض ۱ ثانیه با دستگاه لومینومتر انجام گرفت (خوانش A)

۶- سپس ۱۰۰ ماکرولیتر سوبسترای ® mycoalert (substrate) به هر نمونه اضافه شد و ۱۰ دقیقه زمان گرفته شد.

۷- بعد از ۱۰ دقیقه، خوانش دوم در عرض ۱ ثانیه با دستگاه لومینومتر انجام شد. (خوانش B).

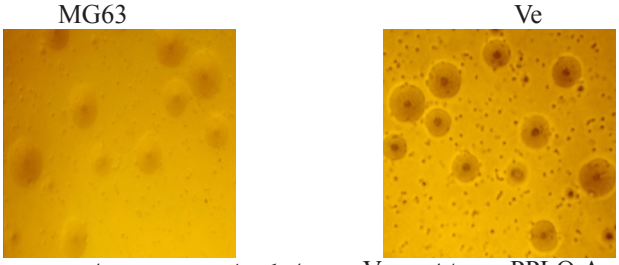
۸- حال نسبت $\text{Ratio}\frac{B}{A}$ که اگر بزرگتر یا کوچکتر از عدد ۱ باشد، به عنوان نسبتی است که آلودگی یا عدم آلودگی مایکوپلاسمایی رده‌ی سلولی مورد نظر را به ما نشان خواهد داد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- لیست رده های سلولی که به صورت تصادفی (Random)جهت بررسی آلودگی مایکوپلاسمایی از آزمایشگاه کشت روتین سلولی به تعداد ۴۰ عدد تحویل گرفته شد که توسط ۳ روش کشت میکروبی و آنزیمی mycoalert mycoplasma detection kit شرکتLonza ومولکولی PCR موردارزیابی و بررسی قرار گرفت:

ردیف	کد بانک سلولی ایران	نام رده های سلولی	مشخصات کلی سلولی
۱	NCBI C612	C6/36	Aedes albopictus(mosquito,Asian tiger)
۲	NCBI C149	MOLT4	Human Acute T lymphoblastic leukemia
۳	NCBI C450	5637	Human bladder carcinoma
۴	NCBI C483	J774A.1	Mouse Monocyte/Macrophage
۵	NCBI C135	MCF7	Human Breast Adenocarcinoma
۶	NCBI C516	MOLT17	Human T cell leukemia
۷	NCBI C161	L929	Mouse connective tissue fibroblast
۸	NCBI C565	QUDB	Human large cell lung carcinoma
۹	NCBI C540	B16F10	Mouse melonema
۱۰	NCBI C549	C1300 Clone NA	Mouse neuroblastoma
۱۱	NCBI C437	HT1080	Human fibrosarcoma
۱۲	NCBI C118	1321N1	Human brain astrocytoma
۱۳	NCBI C131	AGS	Human Caucasian gastric adenocarcinoma
۱۴	NCBI C124	RAJI TK^+	Human Burkitt's lymphoma(Thymidine kinase positive)
۱۵	NCBI C138	RAJI TK^-	Human Burkitt's lymphoma(Thymidine kinase deficient)
۱۶	NCBI C181	KE37	Human T cell acute lymphoblastic leukemia
۱۷	NCBI C577	BE(2)-C	Human neuroblastoma
۱۸	NCBI C578	MDA-MB231	Human breast adenocarcinoma
۱۹	NCBI C153	PC12	Rat Adrenal fibroblast pheochromocytoma
۲۰	NCBI C428	DU145	Human prostatic carcinoma
۲۱	NCBI C433	MDA-MB361	Human breast adenocarcinoma
۲۲	NCBI C209	SKOV3	Human ovary adenocarcinoma
۲۳	NCBI C160	Luckes	Human Burkitt's lymphoma
۲۴	NCBI C103	BL 28	Human Burkitt's lymphoma
۲۵	NCBI C146	SW742	Human Colorectal Adenocarcinoma
۲۶	NCBI C459	MIA Paca-2	Human Pancreatic carcinoma
۲۷	NCBI C482	M-NFS-60	Mouse Myeloid Leukemia
۲۸	NCBI C456	Mel3	Rhesus mammary gland carcinoma
۲۹	NCBI C141	G-8	Mouse Swiss Webster myoblast
۳۰	NCBI C207	SKBR3	Human breast adenocarcinoma
۳۱	NCBI C137	A549	Human-lung-carcinoma
۳۲	NCBI C143	COS7	Monkey Kidney SV40 Transformed
۳۳	NCBI C110	B95.8	Marmoset-EBV transformed lymphocytes
۳۴	NCBI C114	El4	Mouse T Cell lymphoma
۳۵	NCBI C111	CHO	Chinese hamster Ovary
۳۶	NCBI C515	NB4	Human acute promyelocytic leukemia
۳۷	NCBI C598	HSKMC	Human fetal skeletal muscle cells
۳۸	NCBI C555	MG63	Human osteosarcoma
۳۹	NCBI C212	Nalm6	Pre B cell leukemia
۴۰	NCBI C453	Saos2	Human osteogenic sarcoma



شکل۱- کشت میکروبی بر روی محیط PPLO Agar رده سلولی Vero به عنوان کنترل مثبت (سمت راست) و رده سلولی MG63 (سمت چپ)آلوده به مایکوپلاسما

www.SID.ir

Archive of SID

ه) روش شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی به روش مولکولی PCR

برای انجام PCR اختصاصی جنس مایکوپلاسما، قبل از هر چیز بایستی به استخراج DNA مایکوپلاسمایی از نمونه سلول مشکوک به آلودگی مایکوپلاسمایی انجام شود که در همین ارتباط ، روش های متعددی برای استخراج DNA مایکوپلاسمایی از سوپ سلولی (سوپرناتانت) و یا خود پلت سلولی (رسوب سلولی) وجود دارد که از آن جمله می‌توان روش‌های ۱- سانتریفوژ کردن ۲- جوشاندن ۳- استفاده از آنزیم پروتئیناز K را نام برد. در این تحقیق برای استخراج DNA ژنومیک از گونه‌های مختلف مایکوپلاسما و رده‌های سلولی مورد نظر مطابق با پروتوکل‌های استاندارد شرح داده شده توسط Tang و همکارانش (سال ۲۰۰۰ میلادی) البته باکمی اصلاحات استفاده شد (۴۷). ابتدا از محیط کشت سلولی حاوی رده سلولی مورد نظر که به فاز انتهایی لگاریتمی رشد خود رسیده‌اند، مقداری حداقل ۱۰۰/۰۰۰ تا۲۰۰/۰۰۰ سلول مورد نظر هاروست شده به مدت ۱ دقیقه با دور g۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند. سپس رسوب سلولی (پلت سلولی) در بافر STE (۱۰ میلی‌مول Nacl ،۲۰ میلی‌مول تریس HCL و ۱ میلی‌مول EDTA با PH برابر ۸) دوباره به صورت سوسپانسیون در آمده و برای مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۱٪ $\frac{\text{وزن}}{\text{حجم}}$ SDS و۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئیناز K (Promega,USA) انکوبه گردیدند. سپس پروتئین ها با اضافه کردن حجم معادل فنل- کلروفرم- الکل ایزوآمیل به نسبت (۱:۲۴:۲۵) رسوب گردیدند. مجموع اسیدهای نوکلئیک یا DNA، سپس با اضافه کردن ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار (با pH برابر ۵/۲) و ۲/۵ حجم الکل اتانول ۹۶٪ ($\frac{\text{حجمی}}{\text{حجمی}}$) رسوب گردیدند. در ادامه، رسوب سلولی (پلت سلولی)، با الکل اتانول ۷۰٪ ($\frac{\text{حجمی}}{\text{حجمی}}$) شستشو داده شده و برای مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در معرض هوا قرار گرفته تا کاملاً خشک شود. سرانجام رسوب DNA سلولی در آب مقطر استریل فاقد DNA و RNA به صورت سوسپانسیون در آمد و جهت نگهداری طولانی مدت، DNA مربوطه را به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل کرد (۴۷،۳۴،۳۳).

و- اولیگونوکلئوتیدها و PCR اختصاصی برای تشخیص مایکوپلاسما در رده‌های سلولی آلوده

برای شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی رده‌های سلولی مربوطه به روش PCR، یک پرایمر یونیورسال (عمومی) با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری مربوطه (Gene-Runner نسخه ۳/۰۵) براساس ناحیه محافظت شده بین گونه‌ای 16SrRNA ریبوزومی مولیکوت ها طراحی و توسط شرکت سیناژن سفارش و ساخته شد (۳۴،۳۳). پرایمر یونیورسال مربوطه به ترتیب دارای مقادیر مساوی نوکلئوتید تیمین و سیتوزین در موقعیت ۱۳ (Y) برای پرایمر جلویی با طول bp ۲۲ و مقادیر مساوی نوکلئوتید آدنین و گوانین در موقعیت ۲۰ (R) برای پرایمر عقبی با طول bp ۲۱ می‌باشد(جدول ۲) و در حجم ۲۵ ماکرولیتر اجزاء مخلوط واکنش PCR فراهم شده به ترتیب عبارتند از: بافر PCR x۱۰ (۲/۵ ماکرولیتر)، دی‌نوکلئوتیدتری فسفات‌ها (dNTPها) با غلظت ۵۰ میکرومول (۱ ماکرولیتر)، پرایمرهای جلویی و عقبی با غلظت ۱۵ پیکومول از هر کدام (۳ ماکرولیتر از هر کدام)، آنزیم Taq DNA پلیمراز با غلظت 1U (۱ ماکرولیتر)، کلرید منیزیم ($mgcl_2$) با غلظت ۱/۵ میلی‌مول (۱ ماکرولیتر)، آب مقطر استریل و DNA-RNA free (۱۲/۵ ماکرولیتر) و DNA ژنومیک مایکوپلاسمایی با غلظت ۰/۱ میکروگرم و یا DNA رده‌ی سلولی مورد نظر با غلظت ۱ میکروگرم (۱ ماکرولیتر) به عنوان DNA الگو واکنش می باشد. برنامه پروفایل حرارتی سیکل هایPCR به قرار ذیل می باشد: دمای ابتدایی یا دمای دناتوراسیون(واسرشت اولیه)، دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۳ دقیقه و برنامه پروفایل حرارتی PCR برای ژن مربوطه در ۳۲ سیکل شامل: دمای دناتوراسیون (واسرشت) در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۰ ثانیه و دمای گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۲ دقیقه و دمای اتصال پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلاسما (یونیورسال) ۵۵ درجه سانتی‌گراد و دمای اتصال پرایمرهای اختصاصی گونه‌های مایکوپلاسما ۶۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و سایر شرایط PCR اختصاصی جنس و گونه مایکوپلاسما یکسان است و سپس محصولات PCR با ژل آگاروز ۱٪ درصد ($\frac{\text{وزن}}{\text{حجمی}}$) آنالیز گردیده و قطعات DNA

www.SID.ir

Archive of SID

تکثیری توسط دستگاه UV ترانس لومیناتور، بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد بررسی واقع گردیدند. ضمناً طول قطعه تکثیر یافته (آمپلیکون سایز) و درصد سیتوزین و گوانین و دمای ذوب پرایمرهای جلویی و عقبی و سکانس (ترادف) پرایمرهای یونیورسال مخصوص جنس مایکوپلاسما، مطابق جدول مربوطه (جدول ۲) می‌باشد در آخر لازم به تذکر است که برای انجام PCR مناسب، نیاز ضروری به بهینه‌سازی و روش PCR اختصاصی برای جنس و گونه‌های مختلف مایکوپلاسماها، کاملا محسوس و ضروری می‌باشد.

یافته‌ها

در این پژوهش از ۴۰ رده‌ی سلولی حیوانی و انسانی که به طور تصادفی (Random) از آزمایشگاه روتین کشت سلولی تحویل گردیده بود، توسط ۳ روش مختلف کشت میکروبی و آنزیمی Mycoalert® Mycoplasma detection kit و مولکولی PCR مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفتند (جداول ۳) و ضمناً از رده‌ی سلولی Vero آلوده به *مایکوپلاسما* (به عنوان کنترل مثبت واکنش) و رده‌ی سلولی NSO عاری از آلودگی مایکوپلاسما (به عنوان کنترل منفی واکنش) قبلاً توسط ۳ روش مختلف ذکر شده مورد بررسی قرار گرفته بودند که آلودگی رده‌ی سلولی Vero (رده‌ی سلولی کنترل مثبت) که آلودگی آن به مایکوپلاسما توسط هر دو روش PCR اختصاصی جنس و گونه مایکوپلاسما (که آلوده به ۳ گونه *مایکوپلاسما هیورینیس*، *آرژی‌نینی*، *فرمنتنس* می‌باشد که از جمله گونه‌های غالب مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی محسوب می‌شوند) علاوه بر روش‌های کشت میکروبی و آنزیمی ®mycoalert (اشکال ۱، ۲، ۳) مورد تایید قرار گرفت و ضمناً رده‌ی سلولی NSO (رده سلولی کنترل منفی) توسط هر ۳ روش کشت میکروبی و آنزیمی ®mycoalert و ملکولی PCR، منفی تشخیص داده شد. یافته‌های ما در ارتباط با کشت میکروبی ۴۰ رده‌ی سلولی، نشان می‌دهد که تعداد موارد مثبت (۱۶ مورد) با درصد (۴۰) و تعداد موارد منفی (۲۴ مورد) با درصد (۶۰) و در روش آنزیمی آزمون ®mycoalert از ۴۰ رده‌ی سلولی، تعداد موارد مثبت (۲۱ مورد) با درصد (۵۲/۵) و تعداد موارد منفی (۱۹ مورد) با درصد (۴۷/۵) و در روش مولکولی PCR اختصاصی جنس مایکوپلاسما با پرایمرهای یونیورسال طراحی شده از ۴۰ رده سلولی، تعداد موارد مثبت (۲۳ مورد) با درصد (۵۷/۵٪) و تعداد موارد منفی (۱۷ مورد) با درصد (۴۲/۵٪) نشان داده شدند و موارد منفی کاذب در روش کشت میکروبی و آنزیمی ®mycoalert، به ترتیب ۷ و ۲ مورد مشاهده گردیدند و موارد مثبت کاذب در هیچ مورد دیده نشدند. در ضمن با توجه به اینکه طبق اعلام شرکت سازنده Lonza حساسیت شناسایی روش آنزیمی®mycoalert برای شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت های سلولی کمتر از $50\ \mathrm{cfu/ml}$ اعلام گردیده است به عنوان مثال حساسیت آن برای تشخیص گونه های *آکوله پلاسما لایدلاویی* و *مایکوپلاسما هیورینیس* و *مایکوپلاسما اورال* $20\text{-}10\ \mathrm{cfu/ml}$ گزارش گردیده است. همچنین در تحقیقی که ما در این مطالعه انجام شد، رقت های مختلفی از کنترل مثبت خود کیت و رده ی سلولی آلوده به مایکوپلاسما (رده سلول Vero آلوده به مایکوپلاسما به عنوان کنترل مثبت) و سوش *آکوله پلاسما لایدلاویی* رقت های مختلفی از $\frac{1}{2}$ تا $\frac{1}{4096}$ تهیه گردید و حساسیت آزمون کیت مزبور تا رقت $\frac{1}{256}$ (جدول ۴) مثبت گردید. در ضمن در دمای اتصال 55° درجه سانتی‌گراد، جفت پرایمر یونیورسال طراحی شده در آزمون PCR یک باند اختصاصی با سایز ۴۲۵ جفت باز با همه گونه‌های مایکوپلاسمایی مورد آزمایش و همین طور با همه گونه‌های *مولیکوتس* ایجاد نمود و در آزمون ویژگی جفت پرایمرهای یونیورسال طراحی شده، هیچ محصول اختصاصی (۴۲۵ جفت باز) با DNA باکتری‌های غیرمایکوپلاسمایی مورد آزمایش نظیر *استاف اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *پروتئوس میرابیلیس* و *سودموناس آئروژینوزا* و DNA رت ، انسان و سایر یوکاریوت‌های پست دیده نشد (اشکال ۴و۵) و همچنین برای پی بردن به حساسیت پرایمر یونیورسال طراحی شده برای آزمون PCR، رقت‌های مختلفی از DNA استخراج شده سوش آکوله پلاسما لایدلاویی به صورت رقت های متوالی تهیه گردید و محصول تکثیری تا رقت 10^{-8} (معادل ۱۰ فمتوگرم یا $10\ \mathrm{cfu/ml}$) مثبت گردید و این نشان از حساسیت و ویژگی و دقت بسیار بالای تکنیک PCR نسبت به سایر روش‌های مستقیم و غیرمستقیم دارد (شکل ۶).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- جدول توالی مربوط به پرایمر های اختصاصی جنس و گونه های مختلف مایکوپلاسما

mycoplasma species	Primer sequence	Amplicon size	GC	Tm
Universal primer	S:GTG GGG AGG AAA YAG GAT TAG A AS:GGC ATG ATG ATT TGA CGT CRT	425 bp	45 to 50 45 to 48	53 to 54.8 50.5 to 52.4
M.arginini	S: TGA TCA TTA GTC GGT GGA GAG TTC AS: TAT CTC TAG AGT CCT CGA CAT GAC TC	326bp	46 46	55.7 58
M.orale	S: TGA TCA TTA GTC GGT GGA AAA CTA AS: TAT CTC TAG AGT CCT CGA CAT GAC TC	325bp	38 46	52.3 58
M.hyorhinis	S: CGA TGA TCA TTA GTT GGT GGA ATA AAT AS: AGG CAG TAT CTC TAG AGT CCT TAA CTT A	334bp	33 39	53.7 57
M.fermentans	S: TGA TCA TTA GCT GAT GGG GAA CT AS: TCT CTT AGA GTC CTC AAC TAA ATG	324bp	43 38	53.5 52.3
M.genitalium	S: ATA GAT ACT AGC TGT CGG AGC GAT AS: CCA ATT TAC ATT AGC AGT CTC GTT AA	335bp	46 35	55.7 53.2
A.laidlawii	S: GAT GAG AAC TAA GTG TTG GCC ATA A AS: CGC TAG AGT CCC CAA CTT AAT GA	300bp	40 48	54.4 55.3
M.hominis	S: ATC ATT AGT CGG TGG AGA ATC A AS: GCA GTA TCT CTA CTA GAG TCC TCA ACT TAAT	301bp	41 39	55.1 59.1
M.pirum	S: TGG ATG TTA GAT GTC GGG GTA AA AS: GTT GGC AGT ATC GCT AGA CAA A	324bp	43 41	53.5 56.7
M.pneumoniae	S: GAT ACT AGC TGT CGG GGC GAT AS: AAT TTG CAT TAG TAG CAG TCT CGC TAG	329bp	57 41	56.3 56.7
M.salivarium	S: GAT CAT TAG TCG GCA GAG AAC TCG AS: TAT CTC TAG AGT CCT CGA CAT GAC TC	324bp	50 46	57.4 58
U.urealyticum	S: CAT CAT TAA ATG TCG GCT CGA A AS: CGG TAG CAG TAT CGC TAG AAA AGC	323bp	41 50	51.1 57.4

www.SID.ir

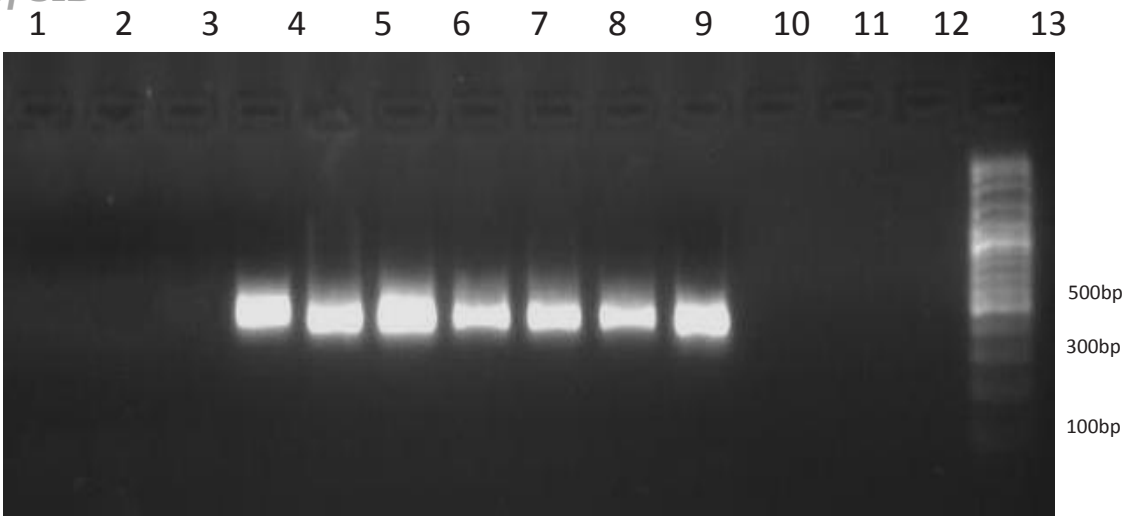
Archive of SID

جدول ۳- نتایج ارزیابی ۴۰ رده سلولی مشکوک به آلودگی مایکو پلاسمایی که توسط آزمون های مختلف ۳ روش کشت میکروبی ، مولکولیPCR وآنزیمی mycoalert شرکت Lonzaمورد بررسی وارزیابی قرار گرفت:

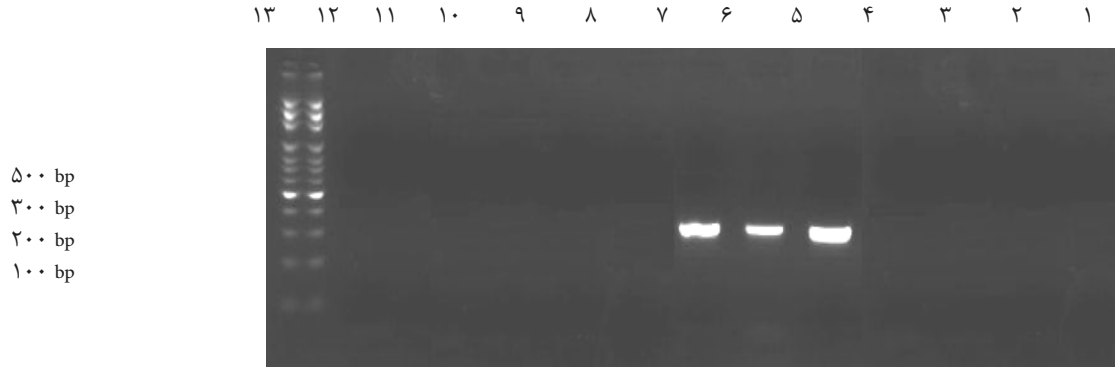
ردیف	کد بانک سلولی ایران	نام رده های سلولی	نتایج آزمون		
			کشت میکروبی	mycoalert	PCR
۱	NCBI C612	C6/36	negative	negative	negative
۲	NCBI C149	MOLT4	negative	negative	negative
۳	NCBI C450	5637	negative	negative	negative
۴	NCBI C483	J774A.1	negative	negative	negative
۵	NCBI C135	MCF7	positive	positive	positive
۶	NCBI C516	MOLT17	Negative(False-negative)	positive	positive
۷	NCBI C161	L929	positive	positive	positive
۸	NCBI C565	QUDB	positive	positive	positive
۹	NCBI C540	B16F10	Negative(False-negative)	positive	positive
۱۰	NCBI C549	C1300 Clone NA	positive	positive	positive
۱۱	NCBI C437	HT-1080	negative	negative	negative
۱۲	NCBI C118	1321N1	negative	negative	negative
۱۳	NCBI C131	AGS	positive	positive	positive
۱۴	NCBI C124	RAJI TK^{+}	Negative(False-negative)	Positive(weak	positive
۱۵	NCBI C138	RAJI TK^{-}	negative	negative	negative
۱۶	NCBI C181	KE-37	positive	positive	positive
۱۷	NCBI C577	BE(2)-C	positive	positive	positive
۱۸	NCBI C578	MDA-MB231	Negative(False-negative)	positive	positive
۱۹	NCBI C153	PC12	positive	Negative(False-	positive
۲۰	NCBI C428	DU145	positive	positive	positive
۲۱	NCBI C433	MDA-MB361	negative	negative	negative
۲۲	NCBI C209	SKOV3	negative	negative	negative
۲۳	NCBI C160	Luckes	negative	negative	negative
۲۴	NCBI C103	BL28	negative	negative	negative
۲۵	NCBI C146	SW742	negative	negative	negative
۲۶	NCBI C459	MIA Paca-2	Negative(False-negative)	Negative(False-	positive
۲۷	NCBI C482	M-NFS-60	Negative(False-negative)	positive	positive
۲۸	NCBI C456	MEL-III	Negative(False-negative)	positive	positive
۲۹	NCBI C141	G-8	positive	positive	positive
۳۰	NCBI C207	SKBR3	positive	positive	positive
۳۱	NCBI C137	A549	negative	negative	negative
۳۲	NCBI C143	COS7	positive	positive	positive
۳۳	NCBI C110	B95.8	negative	negative	negative
۳۴	NCBI C114	EL4	positive	positive	positive
۳۵	NCBI C111	CHO	negative	negative	negative
۳۶	NCBI C515	NB4	positive	positive	positive
۳۷	NCBI C598	HSKMC	negative	negative	negative
۳۸	NCBI C555	MG63	positive	positive	positive
۳۹	NCBI C212	Nalm6	negative	negative	negative
۴۰	NCBI C453	Saos2	positive	positive	positive

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- نتایج الگوی الکتروفورز تکثیرمحصول PCR رده های سلولی Vero(مایکوپلاسما مثبت)وNSO (مایکوپلاسما منفی) به عنوان رده های سلولی کنترل مثبت و کنترل منفی تست هایمان به انضمام تعدادی دیگری از رده های سلولی ذخیره شده در بانک سلولی ایران که از بابت آلودگی مایکوپلاسمایی به ترتیب از چپ به راست عبارتند از: حفره اول:کنترل منفی، (DNA-free water)حفره دوم: کنترل منفی رده سلولی (NSO(negative control، حفره سوم: رده سلولی (CHO(negative، حفره چهارم:کنترل مثبت رده سلولی (Vero(positive control، حفره پنجم: رده سلولی (L929(positive ، حفره ششم: رده سلولی (DU145(positive ،حفره هفتم :رده سلولی (MOLT17(positive ،حفره هشتم: رده سلولی (Saos2(positive ، حفره نهم : رده سلولی (B16F10(positive ،حفره دهم: کنترل مثبت رده سلولی (Vero (positive control ،حفره یازدهم: کنترل منفی رده سلولی (NSO(negative control ،حفره دوازدهم: رده سلولی (negative) 5637 ،حفره سیزدهم: رده سلولی (J774.A(negative ،حفره چهاردهم: سایز مارکر(100bp DNA Ladder(Roche VIII



شکل ۳- نتایج الگوی الکتروفورز محصول PCR رده سلولی Vero آلوده به مایکوپلاسما به عنوان کنترل مثبت با پرایمر های اختصاصی گونه های مختلف مایکوپلاسما که به ترتیب از چپ به راست عبارتند از:

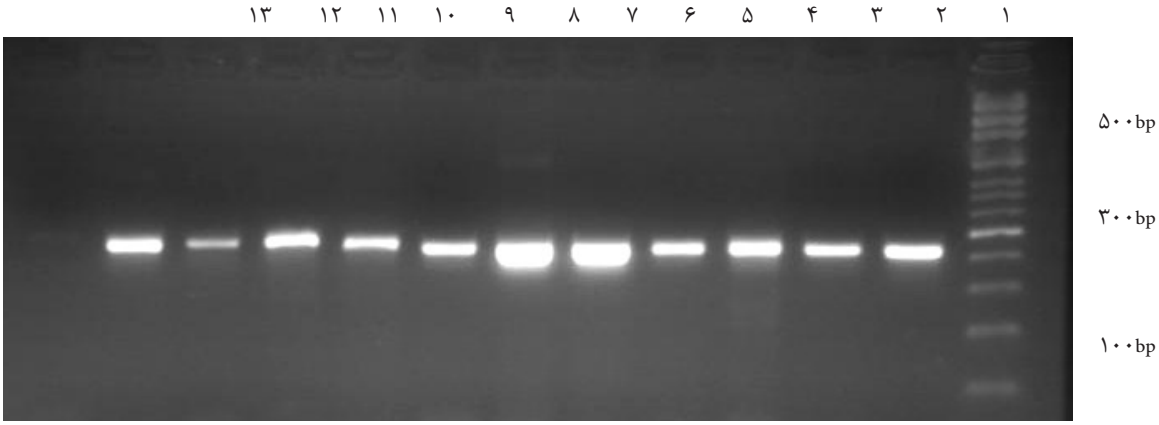
حفره اول: سایز مارکر ۱۰۰ bp DNA Ladder (Roche VIII) ،حفره دوم:با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما هومینیس(منفی) ،حفره سوم:با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما پیروم(منفی) ،حفره چهارم:با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما پنومونیه(منفی) ،حفره پنجم: با پرایمر اختصاصی گونه آکوله پلاسما لایدلاویی(منفی) ،حفره ششم: با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما سالیواریوم(منفی) ،حفره هفتم: با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما هیورینیس(مثبت با آمپلیکون سایزbp ۳۳۴) ،حفره هشتم: با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما آرژینینی(مثبت با آمپلیکون سایز ۳۲۶ bp) ،حفره نهم: با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما فرمنتنس (مثبت با آمپلیکون سایز ۳۲۴ bp) ،حفره دهم: با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما اورال(منفی) ،حفره یازدهم: با پرایمر اختصاصی گونه مایکوپلاسما ژنیتالیوم(منفی) ،حفره دوازهم: با پرایمر اختصاصی گونه اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم)منفی) ،حفره سیزدهم: کنترل منفی) (DNA-free water

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- ارزیابی نتایج آزمون mycoalert mycoplasma detection kit ،کنترل مثبت خود کیت وتهیه رقت های مختلف ۱/۲ تا ۱/۴۰۹۶ از آن و تشخیص حساسیت کنترل مثبت کیت مربوطه با استفاده از دستگاه لومینومترمدل FB12 Berthold detection systems

نتیجه آزمون	B/A	reading B	reading A	کنترل مثبت کیت مربوطه
Positive>۱	۱۵۱/۳۴۵	۲۰۶/۴۳۵	۱/۳۶۴	کنترل مثبت رقیق نشده کیت
Positive>۱	۷۷/۵۵۳	۱۰۳/۴۵۶	۱/۳۳۴	رقت ۱/۲
Positive>۱	۳۰/۹۸۵	۵۱/۶۸۳	۱/۶۶۸	رقت ۱/۴
Positive>۱	۲۱/۳۴۹	۴۷/۱۶۱	۲/۲۰۹	رقت ۱/۸
Positive>۱	۱۱/۸۶۴	۲۴/۶۱۸	۲/۰۷۵	رقت ۱/۱۶
Positive>۱	۴/۵۳۶	۱۲/۸۹۳	۲/۸۴۲	رقت ۱/۳۲
Positive>۱	۲/۳۵۵	۵/۵۵۶	۲/۳۵۹	رقت ۱/۶۴
Positive>۱	۱/۱۷۰	۴/۱۹۰	۳/۵۷۹	رقت ۱/۱۲۸
Positive>۱	۱/۴۵۴	۳/۴۷۹	۲/۳۹۲	رقت ۱/۲۵۶
Negative<۱	۰/۷۹۶	۲/۱۹۰	۲/۷۵۱	رقت ۱/۵۱۲
Negative<۱	۰/۳۷۴	۱/۱۸۵	۳/۱۶۸	رقت ۱/۱۰۲۴
Negative<۱	۰/۴۴۷	۰/۹۸۵	۲/۲۰۳	رقت ۱/۲۰۴۸
Negative<۱	۰/۲۸۶	۰/۵۷۱	۱/۹۹۶	رقت ۱/۴۰۹۶
Negative<۱	۰/۶۳۰	۰/۶۸۱	۱/۰۸۰	کنترل منفی کیت

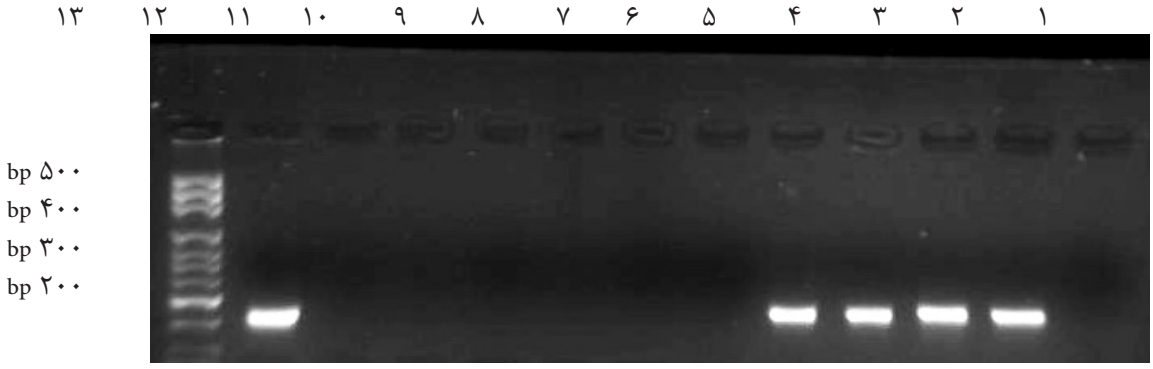


شکل ۴ - نتایج الگوی الکتروفورز تکثیر محصول PCR تعدادی از سوش های مایکوپلاسما با پرایمر یونیور سال طراحی شده جنس مایکوپلاسما که چاهک ها به ترتیب از سمت چپ به راست عبارتند از:

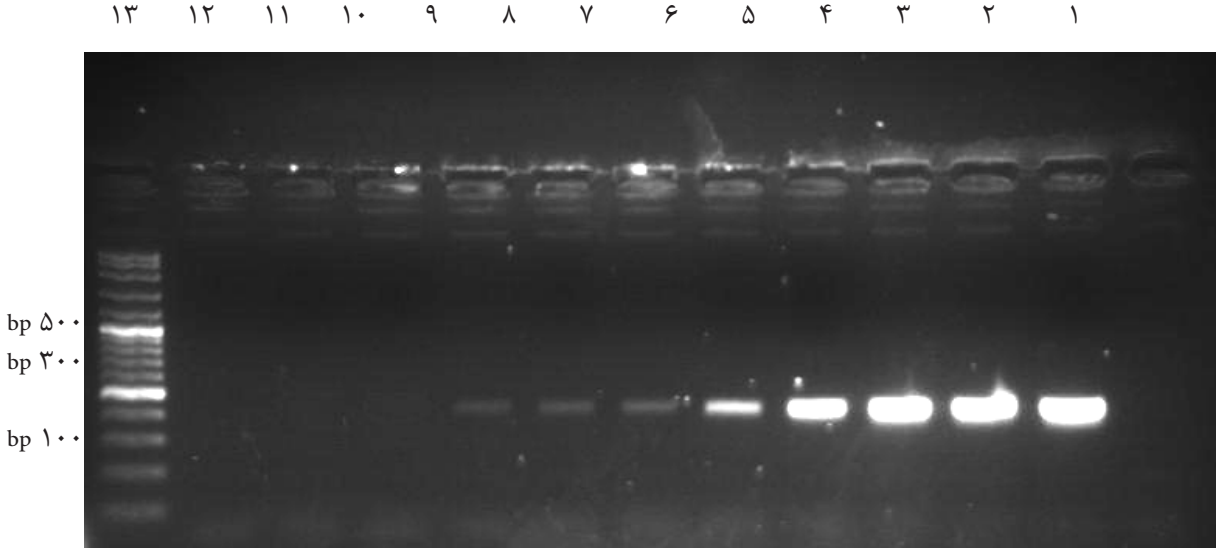
چاهک اول: سایز مارکر VIII (Roche) ۱۰۰bp DNA Ladder ،چاهک دوم: سوش مایکوپلاسما اورالپ ،چاهک سوم: سوش مایکوپلاسما هیورینیس ،چاهک چهارم: سوش مایکوپلاسما آرژینینی ،چاهک پنجم: سوش مایکوپلاسما ژنیتالیوم ،چاهک ششم: سوش مایکوپلاسما هومینیس ،چاهک هفتم: : سوش آکوله پلاسما لایدلاویی ،چاهک هشتم: سوش مایکوپلاسما سالیواریوم ،چاهک نهم : سوش مایکوپلاسما پیروم ،چاهک دهم: سوش مایکوپلاسما پنومونیه ،چاهک یازدهم: سوش اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ،چاهک دوازدهم: سوش مایکوپلاسما فرمنتنس ،چاهک سیزدهم : کنترل منفی(DNA-free water).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- نتایج الگوی الکتروفورز تکثیرمحصولات PCR حاصل از استخراج DNA سلول های آلوده و عاری از مایکوپلاسما و سوش های مختلف باکتری و مایکوپلاسما چاهکها از چپ به راست به ترتیب عبارتند از:
حفره اول: سایز مارکر ۱۰۰bp DNA Ladder(Roche VIII) ،حفره دوم: DNAکنترل مثبت رده سلولVero positive ،حفره سوم:DNA کنترل منفی رده سلولی NSO negative ،حفره چهارم:DNA رده سلولی B۹۵،۸(negative) ،حفره پنجم:DNA سویه باکتری استاف اوروئوس ،حفره ششم: DNAسویه باکتری پروتئوس میرابیلیس ،حفره هفتم: DNAسویه باکتری باسیلوس سوبتیلیس ،حفره هشتم: DNAسویه باکتری سودوموناس آئروژینوزا ،حفره نهم: DNAرده سلولیCOS۷(positive) ،حفره دهم: DNAرده سلولیMG۶۳(positive) ،حفره یازدهم:DNAسوش مایکوپلاسما هومینیس ،حفره دوازدهم: DNAسوش مایکوپلاسما اورال ،حفره سیزدهم:کنترل منفی(DNA-free water)



شکل ۶: نتایج الگوی الکتروفورز آزمایش حساسیت PCR و تهیه رقت های دهدهی از سوش آکوله پلاسما لایدلاویی از رقت ۱- ۱۰ تا رقت۱۰- ۱۰ به منظور حساسیت تشخیص پرایمر مورد نظر و چاهک ها به ترتیب از چپ به راست عبارتند از:
چاهک اول: کنترل منفی(DNA-free water) ،چاهک دوم: رقت ۱- ۱۰ معادل ۱۰۰ نانوگرم (مثبت) ،چاهک سوم :رقت ۲- ۱۰ معادل ۱۰ نانوگرم(مثبت) ،چاهک چهارم: رقت ۳- ۱۰ معادل ۱نانوگرم (مثبت) ،چاهک پنجم: رقت ۴- ۱۰ معادل ۱۰۰ پیکوگرم(مثبت) ،چاهک ششم: رقت ۵- ۱۰ معادل ۱۰ پیکوگرم(مثبت) ،چاهک هفتم: رقت ۶- ۱۰ معادل ۱ پیکوگرم(مثبت) ،چاهک هشتم: رقت ۷- ۱۰ معادل ۱۰۰ فمتوگرم(مثبت) ،چاهک نهم: رقت ۸- ۱۰ معادل ۱۰ فمتوگرم(مثبت) ،چاهک دهم: رقت ۹- ۱۰ معادل ۱فمتوگرم (منفی) ،چاهک یازدهم: رقت ۱۰- ۱۰ معادل ۱۰۰ آتوگرم)منفی) ،چاهک دوازدهم: کنترل منفی) (DNA-free water ،چاهک سیزدهم: سایز مارکرRoche VIII)۱۰۰bp DNA Ladder)

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی و ارزیابی نتایج آزمون های کشت میکروبی و ملکولی PCR و آنزیمی mycoalert® از طریق آنالیز آماری به کمک نرم افزار معتبر و مربوطه به نام IBM SPSS Statistics version 20 ، برنامه (Excell 2007) ، با استفاده از فرمول های مربوطه به شرح ذیل به بررسی پارامتر های آماری زیر پرداخته شد :

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{مثبت واقعی}}{\text{منفی کاذب} + \text{مثبت واقعی}} * 100$$

$$\text{Specificity} = \frac{\text{منفی واقعی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{منفی واقعی}} * 100$$

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{منفی واقعی} + \text{مثبت واقعی}}{\text{تعداد کل}} * 100$$

$$\text{Predictive value of positive result} = \frac{\text{مثبت واقعی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{مثبت واقعی}} * 100$$

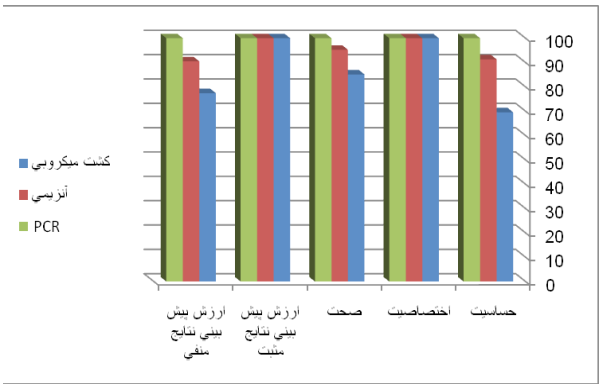
$$\text{Predictive value of negative result} = \frac{\text{منفی واقعی}}{\text{منفی کاذب} + \text{منفی واقعی}} * 100$$

جدول۵- مقایسه پارامترهای آماری مربوط به هر سه روش مورد آزمون

نوع آزمون	میزان حساسیت	میزان اختصاصیت	میزان دقت	ارزش پیش بینی نتایج مثبت
کشت میکروبی	٪۶۹,۵۶	٪۱۰۰	٪۸۵,۱۰	٪۱۰۰
روش آنزیمی	٪۹۱,۳۰	٪۱۰۰	٪۹۵,۲۳	٪۱۰۰
PCR	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

نتایج آزمون آماری

با توجه به جدول شماره ۵ و نمودار شماره ۱ معین می شود که میزان حساسیت، میزان اختصاصیت، میزان صحت، ارزش پیش بینی نتایج مثبت و منفی هر آزمون چند درصد است. .در اینجا روش PCR با تعداد نمونه ۴۰ مورد نسبت به دو روش دیگر



نمودار۱- بررسی پارامترهای آماری به هر سه روش مورد آزمون.

(کشت میکروبی و آنزیمی) از میزان حساسیت بیشتری (۱۰۰٪) برخوردار است، این در حالی است که در شرایط کاملا مشابه میزان حساسیت برای روش کشت میکروبی و آنزیمی با همان تعداد نمونه (۴۰ مورد) به ترتیب این میزان برابر ۶۹,۵۶٪ و ۹۱,۳۰٪ بوده است همچنین میزان اختصاصیت هر سه آزمون برابر ۱۰۰٪ می باشد. میزان دقت هر آزمون به شرح زیر است: آزمون کشت میکروبی میزان دقتی برابر ۸۵,۱۰٪ دارد، آزمون آنزیمی دقتی برابر ۹۵,۲۳٪ و آزمون PCR میزان دقت ۱۰۰٪ را دارا می باشد. اما ارزش پیش بینی نتایج مثبت برای هر سه آزمون برابر ۱۰۰٪ می باشد، اما ارزش پیش بینی نتایج منفی برای آزمون PCR برابر ۱۰۰٪، آزمون آنزیمی ۹۰,۴۷٪ و آزمون کشت میکروبی برابر ۷۷,۴۱٪ میباشد.

مقایسه دو به دو روش ها

مقایسه دو به دو روش های آزمون کشت میکروبی، آنزیمی و PCR به شرح جدول زیر می باشد:

جدول۶- مقایسه دو به دو روش

آزمون		مقدار آماره آزمون t- test	سطح معنی داری
کشت میکروبی	آنزیمی	۱,۹۵۵	۰,۰۵۸
	PCR	۲,۸۷۶	۰,۰۰۶
آنزیمی	PCR	۱,۴۳۳	۰,۱۶۰

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به جدول ۶ معین می شود که چون سطح معنی داری، برای روش کشت و روش آنزیمی برابر ۰/۰۵۸ می باشد و از سطح ۰/۰۵ بیشتر می باشد بنابراین می توان بیان کرد که روش کشت میکروبی و آنزیمی تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند. با مقایسه روش کشت میکروبی و روش PCR با توجه به این که سطح معنی داری، آزمون کمتر از ۰/۰۵ می باشد بنابراین با اطمینان ۹۵٪ می توان گفت روش کشت میکروبی و روش PCR تفاوت معناداری با یکدیگر دارند. به همین ترتیب با مقایسه دو آزمون آنزیمی و PCR چون سطح معناداری بیشتر از ۰/۰۵ می باشد بنابراین با اطمینان می توان بیان کرد که این دو روش نیز تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند.

رتبه بندی روش ها با استفاده از آزمون فریدمن

در این آزمون هرچه میانگین رتبه ها کمتر باشد اهمیت آن متغیر بیشتر است (جداول شماره ۷، ۸).

جدول ۷- میانگین رتبه هر روش

میانگین رتبه	نوع آزمون
۱,۸۹	PCR
۱,۹۶	آنزیمیmycoalert mycoplasma detection kit
۲,۱۵	کشت میکروبی

جدول ۸- نتایج آزمون فریدمن

آماره آزمون	سطح معنی داری
۹,۷۵۰	۰,۰۰۸

با توجه به جدول ۸ چون سطح معنی داری آزمون کمتر از ۰,۰۵ می باشد بنابراین ادعای یکسان بودن اولویت بندی این سه روش رد می شود بنابراین، این سه روش به ترتیب اهمیت اولویت بندی به صورت زیر قابل طبقه بندی می باشند:

۱-روش PCR ۲-روش آنزیمی ۳-روش کشت میکروبی

بحث

کشت‌های سلولی به طور وسیعی در تحقیقات بیولوژیک و بیوتکنولوژی برای تولید فرآورده‌های بیودارویی و بیوزیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مایکوپلاسما از جمله عوامل آلوده کننده معمول و اجتناب ناپذیر رده‌های سلولی است و این مسئله مشکل عمده تحقیقات بیولوژیکی در استفاده از کشت‌های سلولی است و مایکوپلاسماها می‌توانند، پارامترهای متعددی را در کشت‌های سلولی تحت تأثیر قرار دهند که موجب تغییرات بیوشیمیایی ، ژنتیکی و ایمونولوژیکی و غیره شوند که در نتیجه منجر به تفسیر نامناسب آزمایشات و آلودگی فرآورده‌های بیولوژیک خواهد شد (۴۴،۴۲). بنابراین سلول ها می‌بایستی قبل از استفاده حتماً از بابت آلودگی مایکوپلاسمایی غربالگری گردند. ثابت شده است که میزان فراوانی آلودگی رده‌های سلولی به مایکوپلاسما در سرتاسر جهان ۵٪ تا ۳۵٪ و با درصد آلودگی‌های مختلفی[۱۶٪- ۵٪ (۲۸)،۸۷٪- ۵٪ (۳۰،۲۹)،۲۵/۷٪ (۳۶)،۲۹٪ (۴)،۲۳٪(۴۳)، ۳٪ تا ۶۳٪ (۵۱)، ۲۵٪ تا ۲۹٪ (۱۷)، ۱۵٪ تا ۳۵٪ (۱)] گزارش گردیده است. امروزه مایکوپلاسمولوژیست‌ها، تکنیک‌های مستقیم و غیرمستقیم برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی را توسعه داده‌اند. واژه مستقیم اشاره دارد به رشد کلنی میکروبی کلاسیک مایکوپلاسما بر روی محیط کشت آگار که کلنی ها و سلول‌های زنده مایکوپلاسما را مستقیماً مورد تشخیص قرار می‌دهد که از محسنات قابل توجه این روش، این است که چون با مایکوپلاسماهای زنده سروکار داریم که برای ما بسیار ارزشمند است و نتایج مثبت کاذب در کشت های میکروبی بر خلاف روش های غیر مستقیم دیده نمی شود. واژه غیرمستقیم که اشاره دارد به روش‌هایی که محصولات ژنی مایکوپلاسما را اندازه‌گیری می‌کنند یا بر اساس فعالیت‌های آنزیمی و متابولیکی و فرآورده‌های دیگر بنا نهاده شده است. خیلی از این تکنیک‌ها، پیچیده، تفسیر آن ها مشکل، ارزیابی‌های شخصی بحث برانگیز ، طولانی مدت و گران قیمت دارند. یک روش ایده‌آل و مناسب بایستی سریع بوده و حساسیت اختصاصیت (ویژگی) ،دقت (صحت) بالا داشته باشد و تفسیر آن آسان بوده از نظر ارزش اقتصادی مقرون به صرفه باشد. محیط‌های متعدد براث و آگار

www.SID.ir

Archive of SID

برای کشت سلول‌های عاری از مایکوپلاسما و کشت‌های آلوده به مایکوپلاسما وجود دارند که شامل محیط‌های pH- Hay flick, Friis (اصلاح شده و غیر اصلاح شده) و محیط SP4 و DM_1 می‌باشد. برای کنترل کیفیت مناسب و بهتر، نتایج به دست آمده از کشت میکروبی، می‌بایستی با دومین روش تشخیصی تائید گردد و برای گونه‌های مایکوپلاسما که نمی‌توانند در محیط‌های کشت مصنوعی رشد کنند مانند (M.hyorhinis، M.genitalium،M.orale، M.amphoriforme، M.vulturii)، یک اندیکاتور سلولی به عنوان روش انتخابی مورد بررسی قرار خواهد گرفت که از معایب مهم و قابل توجه کشت میکروبی عدم رشد برخی از گونه های مهم مایکوپلاسما نظیر گونه های فوق الذکر در محیط های کشت میکروبی می باشد که باعث ایجاد نتایج منفی کاذب می گردد که در مورد یافته های تحقیقی ما نیز دقیقا ۷ مورد منفی کاذب در آزمون کشت میکروبی مشاهده گردید. همچنین از معایب دیگر روش‌های کشت میکروبی سرعت عمل بسیار پائین به خاطر کند رشد بودن و بالا بودن زمان تکثیرو تقسیم سلولی مایکوپلاسماهاست (زمان تکثیر و تقسیم سلولی سلول های مایکوپلاسمایی ۱ تا ۹ ساعت ذکر گردیده است) که مستلزم گذراندن زمان ۶-۲ هفته وقت در آزمایشگاه برای ظهور احتمالی کلنی های مایکوپلاسمایی می‌باشد (۷). در روش آنزیمی به دلیل اینکه مایکوپلاسما به دلیل فقدان سیستم سیتوکروم، مسیر تنفسی آن ها ناقص می‌باشد، که در غیاب چرخه تری‌کربوکسیلیک اسید به جز فعالیت مالات دی‌هیدروژناز، سیستم تولید ATP (آدنوزین تری‌فسفات) وابسته به فسفریلاسیون اکسیداتیو در آن ها متوقف می‌باشد. بنابراین مسیرهای تخمیری آرژنین و کربوهیدرات که از جمله سیستم‌های بقاء تولید ATP در اکثریت مولیکوت‌ها هستند، به جزء اوره آپلاسما که عمدتاً سیستم تولید ATP در آن ها وابسته به هیدرولیز اوره می‌باشد. کیت mycoalert® ، یک تست بیوشیمیایی است که هدف آن بر اساس حضور آنزیم‌های مایکوپلاسما نظیر استات کینازها و کاربامات کینازها می باشد، که این آنزیم‌ها توانایی این را دارند که در حضور سوبستراهای فسفات استیل و فسفات کاربامویل، آدنوزین دی‌فسفات (ADP) را به ATP (آدنوزین تری‌فسفات) کاتالیز و تبدیل نمایند که این تبدیل باعث تولید یک سیگنال بیولومینسانس سیستم تشخیصی وابسته به لوسیفراز می‌شود که نور ساطع شده (منتشر شده) برای هر نمونه سلولی توسط دستگاه لومینومتر ثبت و اندازه‌گیری می‌شود که از محسنات روش آنزیمی (کیت mycoalert ® mycoplasma detection kitشرکت Lonza) که بر خلاف روش های مولکولی مثل PCR چون با آنزیم های مایکوپلاسمایی و مایکوپلاسما های زنده سروکار داریم از بابت ارزش تشخیصی مایکوپلاسماهای زنده در کشت های سلولی آلوده بخصوص در ادامه روند درمان های کیموتراپیوتیک یا آنتی بیوتیک تراپی برای ما خیلی ارزشمند و با اهمیت می باشد و ضمنا سرعت عمل بسیار بالای این روش، این است که نتایج لومینسانس و کمی لومینسانس که در عرض کمتر از ۲۰ دقیقه با حساسیت، اختصاصیت، دقت و صحت بالا مشخص می گردد و ما در مطالعه حاضر خودمان به جز دو مورد رده‌های سلولی PC12 (کد بانک سلولی NCBI C153) و MIA paca-2 (کد بانک سلولیNCBI C459) که با روش آنزیمی ®mycoalert (منفی کاذب) گزارش گردید، بقیه موارد (۳۸ مورد رده‌های سلولی مابقی) نتایج آزمون PCR از بابت آلودگی و عدم آلودگی مایکوپلاسمایی رده‌های سلولی تست شده با روش آنزیمی ®mycoalert کاملاً مطابقت داشت و در ضمن در این تحقیق ، رقت های مختلفی از کنترل مثبت خود کیت و رده ی سلولی آلوده به مایکوپلاسما (رده سلولی Vero آلوده به مایکوپلاسما به عنوان کنترل مثبت) و سوش آکوله پلاسما لایدلاویی ،رقت های مختلفی به صورت رقت های متوالی تهیه گردید و حساسیت آزمون کیت مزبور تا رقت $\frac{1}{256}$ (جدول ۴) مثبت گردید و از معایب عمده این تکنیک این است که اولا چون با آنزیم های مایکوپلاسمایی سروکار داریم از نظر میزان، تراکم و پایداری آنزیم های مزبور یعنی استات کیناز ها و کاربامات کینازها باید درحد قابل قبول در کشت های سلولی برای تشخیص مایکوپلاسما توسط دستگاه لومینومتر باشند در غیر اینصورت جواب منفی کاذب به دست می آید. ثانیا این تکنیک قادر به شناسایی جنس و گونه های مختلف اوره آ پلاسماها از جمله اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم نمی باشد همچنین قابلیت تشخیص و تعیین گونه های اختصاصی جنس مایکوپلاسما را ندارد (۳۲،۲۶). تکنیک PCR با پروتوکل‌هایی که براساس نواحی 16 Sr RNA و نواحی

www.SID.ir

Archive of SID

S16-23SrRNA ریبوزومی گونه‌های مختلف مایکوپلاسما که شامل PCR تک مرحله‌ای و PCR دو مرحله‌ای (Nested PCR) و PCR اختصاصی جنس و گونه ،ژل الکتروفوروزیس و Real Time PCR بنیان نهاده شده است. نتایج به دست آمده در این مطالعه، دلالت بر این امر دارد که می‌توان از سکانس‌های ثابت و مشترک Sr RNA 16 ریبوزومی موجود در مایکوپلاسما در آزمون مولکولی PCR به عنوان یک هدف مناسب جهت تشخیص گونه‌های متعدد و آلوده کننده مایکوپلاسمایی در سرم های حیوانی، کشت‌های سلولی و فرآورده‌های بیولوژیک استفاده نمود. این روش (PCR مولکولی) به طور ایده‌آل می‌بایستی نه تنها قادر به شناسایی ۸ گونه تیپیک آلوده کننده مایکوپلاسما (مایکوپلاسما هیورینیس، آرژی‌نینی، اورال، فرمنتانس، سالیواریوم،هومینیس، پیروم و آکوله پلاسما لایدلاویی) که عامل بیش از ۹۸٪ آلودگی‌های کشت‌های سلولی می‌باشند را دارا باشد، بلکه می بایستی سایر گونه‌های آلوده کننده مولیکوت‌ها متعلق به جنس‌های مایکوپلاسماها، آکوله پلاسماها، اوره آپلاسماها و اسپیروپلاسماها (که عامل باقی‌مانده ۲٪ آلودگی است) را شناسایی نماید. در این تحقیق سعی شده است که یک سنجش PCR بر پایه پرایمرهای مخصوص جنس مایکوپلاسما و هدف ژنی SrRNA 16 که مقاصد بالا را مهیا کند، توسعه داده شود بر این مبنا با انتخاب سکانس‌های SrRNA 16، تعداد زیادی گونه‌های مختلف مایکوپلاسما و صف بندی و تجزیه و تحلیل کامپیوتری با سکانس‌های دیگر پروکاریوت‌ها، پرایمرهای مخصوص جنس مایکوپلاسما طراحی و ساخته شد. تکثیر *invitro* به وسیله PCR با استفاده از این جفت پرایمر منتج به تکثیر سکانس اعضاء مولیکوت‌ها ذکر شده در بالا و عدم تکثیر هیچ نوع محصول با سایر پروکاریوت‌ها گردید (اشکال ۲و۳). البته در این بررسی، مناسب بودن این جفت پرایمرها و سنجش جهت تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی ثابت گردید و از محسنات قابل توجه روش مولکولی PCR بخصوص در یافته های تحقیقی ما که میزان حساسیت، اختصاصیت، صحت (دقت) و ارزش پیش بینی نتایج مثبت و منفی ۱۰۰٪ را در مقایسه با دو روش کشت میکروبی و روش آنزیمی نشان می دهد همچنین برای پی بردن به حساسیت پرایمر یونیورسال طراحی شده برای آزمون PCR، رقت‌های مختلفی از DNA استخراج شده سوش آکوله پلاسما لایدلاویی به صورت رقت های متوالی تهیه کرده و محصول تکثیری تا رقت 10^{-8} (معادل ۱۰ فمتوگرم یا ۱۰ cfu/ml) مثبت گردید و این نشان از حساسیت و ویژگی و دقت بسیار بالای تکنیک PCR نسبت به سایر روش‌های مستقیم و غیرمستقیم دارد (شکل ۶). از مهم ترین موارد قابل بحث، مزایای تکنیک کشت میکروبی و روش آنزیمی mycoalert® شرکت Lonza این است که در هر دو روش ذکر شده با ارگانیسم‌های زنده مایکوپلاسما سر و کار دارد که این خود مزیتی بر حضور مایکوپلاسماهای زنده در واکنش نسبت به PCR دارد، اما در روش مولکولی PCR با DNA ارگانیسم باکتری مورد نظر ما سرو کار داریم که ممکن است میکروارگانیسم مورد نظر زنده و یا مرده باشد که مثلاً ممکن است که در طول دوره درمان رده‌های سلولی با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مربوطه، ارگانیسم‌های زنده مایکوپلاسما در رده‌ی سلولی مورد نظرکاملاً از بین رفته باشد، اما به خاطر حضور DNA ارگانیسم‌های مرده در کشت سلولی مزبور در واکنش PCR ، موارد مثبت کاذب دیده شود که از جمله معایب قابل توجه نتایج مثبت کاذب روش‌های مولکولی PCR بخصوص آزمون PCR دو مرحله ای مثل Nested PCR محسوب می‌گردد (۵۲). مهم ترین عیب تکنیک رنگ آمیزی DNA با رنگ‌های فلوئوروکروم مشکل تفسیر نتایج آن است. این اشکال ناشی از حضور باکتری‌های آلوده کننده یا اسید نوکلئیک تجزیه شده که باعث ایجاد سیگنال فلوئورسانس خارج هسته‌ایی شده و بدین ترتیب حضور مایکوپلاسما پنهان می‌گردد، ناشی می‌شود بنابراین در رنگ آمیزی DAPI Staining و H33258 موارد مثبت و منفی کاذب به طور قابل توجهی دیده می‌شود. تکنیک هیبریداسیون (دورگه سازی) بر پایه همان اصول PCR بنا نهاده شده است. اگرچه هر دو روش به طور نسبی سریع هستند، اما تفاوت‌هایی با هم دارند به طور مثال، گاهی تفسیر نتایج هیبریداسیون به دلایلی مشکل می‌شود. بدین معنی که نوعاً تفریق بین سیگنال‌های مخصوص و سیگنال‌های غیراختصاصی، به دلیل حضور واکنش متقاطع مابین باکتری‌های گرم مثبت مشکل می‌گردد. بنابراین نتایج مثبت تکنیک هیبریداسیون، فقط زمانی مورد استناد است که کشت میکروبی، هیچ باکتری گرم مثبت دیگری را نشان ندهد.

www.SID.ir

Archive of SID

بنابراین مزیت دیگر PCR حساسیت و اختصاصیت بالاتر آن نسبت به روش های هیبریداسیون (دورگه سازی) و روش آنزیمی ®mycoalert و کشت میکروبی و رنگ آمیزی DNA فلوئوروکروم می‌باشد. حساسیت روش هیبریداسیون rRNA با DNA که حدود 10^3 تا 10^4 ارگانیسم است که در مواردی مانع از تشخیص مایکوپلاسما در نمونه‌های آلوده می‌گردد. در صورتی که در روش مولکولی PCR وReal timePCR دارای حساسیتی در حدود ۱ تا ۱۰ DNA میکروارگانیسم می باشد که نشان از حساسیت بسیار بالای PCR و Real time PCR می باشد.

از جمله بررسی کشت‌های سلولی توسط Del Guidice (۱۹۸۰) و Mc Garriry (۱۹۸۵) با روش کشت میکروبی و PCR نشان دادند که از ۳۰ رده‌ی سلولی آزمایش شده ،۱۴ نمونه با روش PCR مثبت و تنها ۱۰ نمونه با روش کشت میکروبی، مثبت شده بود. دلیل این تفاوت نیز عدم رشد بعضی از سویه‌های مایکوپلاسما هیورینیس در کشت میکروبی پیشنهاد شده است. در سلول آلوده به مایکوپلاسما حداقل می بایستی بیشتر از ۱۰۰۰ باکتری مایکوپلاسما وجود داشته باشد تا روی محیط های مخصوص مایکوپلاسما رشد کنند ولی در روش PCR یا PCR ELISA کمتر از ۱۰ باکتری مایکوپلاسما نیز می‌تواند شناسایی شود (۶۳،۴۹،۳۰،۷). بنابراین موارد فوق مبین برتری‌های تکنیک PCR نسبت به روش‌های کلاسیک خصوصا در مواردی است که تعداد عامل در نمونه کم باشد (درست قبل از تهاجم عفونت، بعد از روش‌های زدودن مایکوپلاسما، یا در حضور سرم با تعداد کم عامل). علی‌رغم مراقبت‌های زیاد و فضاسازی مناسب جهت تکنیک‌های تکثیری همچون PCR، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم‌های تشخیص مولکولی وجود دارد. که در نتیجه باعث به وجود آمدن مثبت‌های کاذب خواهد شد. البته تجربه نشان داده است که با اختصاص فضاها و تجهیزات مناسب در مناطق پیش‌بینی شده، این امکان به صفر نزدیک می‌گردد. لذا انتخاب کنترل‌های مناسب (نظیر کنترل مثبت،کنترل منفی و اینترنال کنترل) در مراحل مختلف استخراج DNA کمک شایانی به کاهش آلودگی و تشخیص مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی دارد. نتایج منفی کاذب PCR عمدتاً به چند دلیل می تواند باشد: ۱- تعداد کم مایکوپلاسماها در نمونه ۲- به هم انباشتگی و متراکم شدن و عدم توزیع مناسب مایکوپلاسماها (بدین معنی که به بخشی از سلول‌های کشت، مایکوپلاسماها چسبیده و بنابراین وقتی که برای اولین بار نمونه تقسیم می‌شود، حضور مایکوپلاسماها در برخی نمونه ها بیشتر است)، ۳- واکنش های زنجیره ای پلیمراز باید از DNA استخراج شده و خالص سلولی که عاری از محصولات زائد تجزیه سلولی سوپرناتانت کشت سلولی برای انجام واکنش مورد استفاده قرار بگیرد، زیرا اجزاء محیط کشت سلولی ممکن است حاوی مواد مهار کننده ای باشد که مانع از انجام فعالیت آنزیم تک DNA پلیمراز شود. بنابراین تکنیک PCR باید حتما به طور مناسب و شایسته برگزیده شود و سایر روش‌های دیگر نیز با حداکثر دقت به مرحله‌ی اجرا گذاشته شود. روش PCR می‌تواند با یک مرحله تکثیر با ۱ جفت پرایمر و یا دو مرحله تکثیر (nested PCR) با ۲ جفت پرایمر صورت پذیرد. دومین مرحله PCR در Nested PCR، حساسیت و اختصاصیت تکنیک مورد نظر را افزایش می دهد. اما یکی از اشکالات و عیوب روش Nested PCR نتایج احتمالی مثبت کاذب تولید شده است که به آلودگی با DNA هدف ارتباط دارد. بنابراین برای انجام آزمون های روتین کشت سلولی، آزمون PCR برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی خیلی مطلوب و رضایت بخش است، اما تیتر مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی باید برای تشخیص آلودگی توسط آزمون PCR، کافی و مناسب باشد. اما شرایط ویژه، مثلاً پس از روش‌های درمان و آنتی‌بیوتیک‌تراپی مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی آلوده یا برای تشخیص مایکوپلاسما در فرآورده‌های کشت سلولی مثل FBS (سرم جنین گاوی) و غیره، روش Nested PCR می‌تواند مفیدتر و مؤثرتر می‌باشد. یکی از روش‌های احتمالی برای افزایش حساسیت این تکنیک ، انجام آزمون RT-PCR (واکنش نسخه‌برداری معکوس PCR) که RNA ریبوزومی را که به میزان زیادی در سلول در مقایسه با DNA کد شده rRNA ریبوزومی وجود دارد، مورد تشخیص و شناسایی قرار می دهد. به هر حال کارکرد و حساسیت RT-PCR برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسما به مراتب بیشتر و مؤثرتر می‌باشد. به طور خلاصه، در هر حال پیشنهاد ما این است که برای تشخیص آلودگی های روتین مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی از PCR تک مرحله‌ای بر اساس شناسایی DNA ژنومیک برای آزمون‌های آلودگی

www.SID.ir

Archive of SID

کشت‌های سلولی استفاده شود. ضمناً آزمایشگاه هایی که به دستگاه PCR دسترسی ندارند، ضروری است که از تکنیک های دیگری نظیر روش هایی کشت میکروبی و رنگ‌آمیزی DNA فلوئوروکروم و سایر روش ها استفاده نمایند، برخی از این متدها به صورت کیت‌های تجاری نیز در دسترس می‌باشند (۵۹). دو تکنیک دیگری نیز که جدیداً بر اساس فلوئورسانس هیبراسیون درجا آزمون (FISH) و تولید ATP (آدنوزین تری‌فسفات) که به ترتیب توسط میکروسکوپ فلوئورسانس و لومینومتر برای تشخیص آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما نتایج اولیه تحقیقاتی در مورد پارامترهای ذکر شده در بالا، به ویژه با توجه به سرعت عمل این روش‌ها بسیار نوید بخش و امیدوار کننده است. نتایج تست FISH در حدود ۲ تا ۳ ساعت انجام می‌شود و نتایج تست لومینسانس می‌تواند در عرض کمتر از ۲۰ دقیقه تعیین گردد. همه تکنیک های شرح داده شده در بالا، در زمانی که کشت‌های سلولی تحت درمان با آنتی بیوتیک‌ها قرار می‌گیرند، منفی می‌گردند. در حالت کلی همه کشت‌های سلولی درمان شده می‌بایستی حداقل برای ۲ هفته در محیط بدون آنتی‌بیوتیک قرار بگیرند، قبل از اینکه سلول‌ها دوباره تست شوند (۵۳). پیشنهاد مایکوپلاسمولوژیست‌ها این است که برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی حداقل ۲ تا ۳ روش جدید به صورت پارالل و مستقل و توأمان با هم برای شناسایی کامل آلودگی مایکوپلاسما مورد ارزیابی قرار گیرند و سلول‌ها باید تا زمانی که همه تست‌های تشخیصی عاری بودن و یا آلوده بودن رده‌ی سلولی مزبور را از مایکوپلاسما نشان نداده، در آزمایشگاه قرنطینه کشت سلولی نگهداری شوند. در طول کشت‌های سلولی مستمر و مداوم، یک روش حساس و دقیق می‌بایستی به طور منظم و فعال برای کنترل کیفی و مدیریت بر کشت‌های سلولی مورد نظر، مورد استفاده قرار بگیرد.

نتیجه گیری

پس بطور خلاصه نتایج بدست آمده در این تحقیق توسط روش های مولکولی PCR در مقایسه با روش های آنزیمی ®Mycoalert و کشت میکروبی میزان حساسیت، اختصاصیت، میزان دقت (صحت) و ارزش پیش بینی نتایج مثبت و منفی ۱۰۰٪ را برای تکنیک مولکولی PCR و در ادامه به ترتیب ۹۱,۳۰٪ ، ۱۰۰٪ ،۹۵,۲۳٪ ، ۱۰۰٪ و ۹۰,۴۷٪ را برای آزمون آنزیمی ®Mycoalert و ۶۹,۵۶٪ ، ۱۰۰٪ ، ۸۵,۱۰٪ ، ۱۰۰٪ و ۷۷,۴۱٪ را برای آزمون کشت میکروبی به ما نشان می دهند. بنابراین سنجش PCR بر مبنای سکانس‌های ثابت و مشترک موجود در SrRNA 16 ریبوزومی به عنوان یک تکنیک مفید، ارزشمند و قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی و دقت بسیار بالا جهت تشخیص و شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی و سایر فرآورده‌های بیولوژیک (نسبت به سایر روش ها) مطرح می باشد. از آنجایی که روش معمول برای تشخیص آلودگی رده‌های سلولی به مایکوپلاسما، روش های کشت میکروبی و رنگ آمیزی DNA فلوئوروکروم هستند و این روش ها اولا زمان‌بر بوده و همچنین از حساسیت پایینی نیز برخوردار هستند (موارد منفی و مثبت کاذب متعدد و فراوان) و سرعت عمل در تشخیص آلودگی رده‌های سلولی، به منظور درمان رده‌ی سلولی آلوده و جلوگیری از آلوده شدن رده‌های سلولی سالم بسیار حائز اهمیت می باشد، بنابراین برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کشت های سلولی روش آنزیمی ®Mycoalert (فقط ۲ مورد منفی کاذب) با توجه به حساسیت و ویژگی و سرعت عمل بسیار بالای آن در تشخیص آلودگی مایکوپلاسما (زمان تشخیصی در کمتر از ۲۰ دقیقه) بعد از روش های مولکولی Real time PCR و PCR می‌تواند جایگزین روش‌های کشت میکروبی و رنگامیزی DNA فلوئوروکروم شود و به صورت همزمان همراه با تکنیک های مولکولی برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی به عنوان یک روش انتخابی مطرح و مورد استفاده قرار گیرد. در هر صورت، مقایسه مابین تکنیک های مولکولیPCR با کشت میکروبی، روش‌های رنگ آمیزی DNA با رنگ‌های فلوئوروکروم و تکنیک هیبریداسیون (دو رگه سازی) اسید های نوکلئیک و روش‌های آنزیمی کیت ®Mycoalert شرکت Lonza موید این موضوع است که آزمون مولکولیPCR تکنیک و روشی حساس، سریع و موثر و مطمئن با کارایی بسیار بالا (۱۰۰٪) می باشد (۲۵). البته به منظور افزایش بازدهی (کارآیی) PCR در جهت بالا بردن حساسیت و ویژگی و صحت عمل آن نیاز به تحقیقات

www.SID.ir

Archive of SID

بیشتری در زمینه استخراج DNA، روش‌های تغلیظ نمونه، سکانس‌های هدف ژنی PCR، نوع و طراحی مناسب پرایمر، پروب و اینترنال کنترل، روش های شناسایی محصول تکثیری، گونه مایکوپلاسمایی آزمایش شده و بهینه‌سازی شرایط اپتیمال PCR و عدم توقف واکنش‌های PCR با DNA نمونه کاملاً محسوس و ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله اینجانب بر خود لازم و ضروری می دانم که از اعضاء و پرسنل محترم بخش بانک سلولی ایران به ویژه ریاست محترم بخش بانک سلولی جناب آقای دکتر محمد علی شکرگزار و همکاران گرامی آقایان دکتر امیر امان زاده ، دکتر شهرام آذری، دکترشاهین بنکدار و آقای حسن صنعتی و خانم ها سرکار خانم ناهید احمدی، تهمینه موسوی و لیلا قاضی زاده و کلیه همکاران و عزیزانی که نهایت مساعدت و همکاری را در به انجام رساندن این پروژه تحقیقاتی داشته اند ،کمال تشکر و امتنان را داشته و از درگاه ایزد منان برای همگی سلامتی، شادی و آرزوی موفقیت خواستارم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(1)Barile MF, Hopps HE, Grabowski MW.Incidence and Sources of Mycoplasma Contamination: A Brief Review.In: Mycoplasma Infection of Cell Cultures. McGarrity GJ, Murphy DG, Nicholas WW, Editors. New York: Plenum Press, 1978; 35-45.

(2)Barile MF, Mycoplasma-Tissue Cell Interactions.The Mycoplasmas.New York, NY, Academic Press, 1979; 425-474.

(3)Barile MF, Rottem S. Mycoplasmas in Cell Cultures.In: Kahana I, Adoni A (Eds.), Rapid Diagnosis of Mycoplasmas. New York, Plenum Press, 1993; 155-193.

(4)Bolske G.Survey of Mycoplasma Infections in Cell Cultures and a Comparison of Detection Methods.Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1988; 269(3):331-340.

(5)Bonissol C, Traincard F, Stoiljkovic B, Hosli P.Adenosine Phophorylase Activity as a Technique for Detection of Mycoplasmas in Biological Media.Ann Inst Pasteur Microbiol ,1984;135(A):63-72.

(6)Cheng HS, Shen CW, Wang SR.Effects of Storage Condition on Detection of Mycoplasma in Biopharmaceutical Products.Iv Vitro Cell Dev Biol Anim, 2007; 43:113-9.

(7)Del Guidice RA, Gardella RS & Hopps HA.Cultivation of Formerly Non-Cultivable Strains of Mycoplasma hyorhinis. Curr Microbiol, 1980; 4:75-80.

(8)Drexler HG, Uphoff CC.Contamination of Cell Culture, Mycoplasma.In: Spier y.NewYork, Wiley, 2000; 609-627.

(9)Drexler HG, Dirks WG, MacLeod RAF, Quentmeier H, Steube KG, Uphoff CC.DSMZ Catalogue of Human and Animal Cell Lines,8th edn. DSMZ, Brunschweig, 2001.

(10) Drexler HG, Uphoff CC, Dirks WG, MacLeod RAF. Mix-Ups and Mycoplasma: The Enemies with in.Leukemia Res 2002a; 26:329-333.

(11)Drexler HG, Uphoff CC.Mycoplasma Contamination of Cell Cultures: Incidence, Sources, Effects, Detection, Elimination, Prevention.Cytotechnology, 2002b; 39:75-90.

(12) EP.6.1 (2008) European Pharmacopoeia 6.1.2008.

(13)FDA (1993) Food and Drug Administration.Center for Biologics Evaluation and Research.Points to Consider in "Characterization of Cell Lines Used to Produce Biological" Rockville, MD: US Department of Health and Human Service, 1993.

(14)FDA (2010) Food and Drug Administration.Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry:"Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infection Disease Indication."Rockville, MD: US Department of Health and Human Service, 2010.

(15)Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K, Kato I. Detection and Tentative Identification of Dominant Mycoplasma Species in Cell Cultures by Restriction Analysis of the 16S-23SrRNA Intergenic Spacer Regions.Res Microbiol, 1993;144:489-493.

(16)Harasawa R, Mizusawa H, Fujii M, Yamamoto J, Mukai H, Uemori T,Etal. Rapid Detection and Differentiation of the Major Mycoplasma Contaminants in Cell Cultures Using Real-Time PCR with SYBR Green I and Melting Curve

www.SID.ir

Archive of SID
Analysis.Microbiol Immunol , 2005;49:859-63.

(17)Harlin H, Gajewski.Diagnosis and Treatment of Mycoplasma-Contaminated Cell Cultures.Curr Protoc Cytom, 2008; Appendix 3: Appendix 3C.

(18)Hart MK, Del Giudice RA, Korch GW .Absence of Mycoplasma Contamination in the Anthrax Vaccine.Emerg Infect Dis, 2002; 1:94-96.

(19)Hay RJ, Macy ML, Chen TR. Mycoplasma Infection of Cultured Cells. Nature, 1989; 339:487-488.

(20)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 .

(21)Ishikawa Y, Kozakai T, Morita H, Saida K, Oka S, Masuo Y.Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures Using SYBR Green-based Real-Time Polymerase Chain Reaction. In Vitro Cel Dev Biol Anim, 2006; 42:63-69.

(22)Jurmanova K, Hajkova M, Fischer O.Detection of Mycoplasmas in Cell Cultures.Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr, 1990; 20:947-948.

(23)Kong H,Volokhov DV, George J, Ikonomi P, Chandler D, Anderson C, Etal. Application of Cell Culture Enrichment for Improving the Sensitivity of Mycoplasma Detection Methods Based on Nucleic Acid Amplification Technology(NAT). Appl Microbiol Biotechnol, 2007;77:223-232.

(24)Lawrence B, Bashiri H, Dehghani H. Cross Comparison of Rapid Mycoplasma Detection Platforms. Biologicals, 2010; 38:218-23.

(25)Lehmann D, Jouette S, Olivieri F, Laborde S, Rofel C, Simon E, Etal.Novel Sample Preparation Method for Molecular Detection of Mollicutes in Cell Culture Samples. J Microbiol Methods 2009; 80:183-189.

(26)Mariotti E, Mirabelli P, Di Noto R, Fortunato G, Salvatore F.Rapid Detection of Mycoplasma in Continuous Cell Lines Using a Selective Biochemical Test. Leuk Res, 2008; 32:323-326.

(27)Markoullis K, Bulian D, Holzlwimmer G, Quintanilla-Martinez L, Heiliger KJ, Zitzelsberger H, Scherb H,Etal. Mycoplasma Contamination of Murine Embryonic Stem Cells Affects Cell Parameters, Germline Transmission and Chimeric Progeny. Transgenic Res, 2009; 18(1):71-87.

(28)Mc Garrity GJ, Vanaman V, Sarama J.Cytogenetic Effects of Mycoplasmal Infection of Cell Cultures: a Review.In Vitro, 1984; 20:1-18.

(29)Mc Garrity GJ, Kotani H. Cell Culture Mycoplasmas.In: The Mycoplasmas IV.Rasin S and Barile MF, Editors.New York: Academic Press Inc, 1985a; 353-390.

(30)Mc Garrity GJ, Sarama J, Vanaman V.Cell Culture Techniques.Am Soc Microbiol, 1985b; 51: 170-183.

(31)Mc Garrity GJ, Kotani H, Butter GH.Mycoplasmas and Tissue Culture Cells.In: Maniloff J (Editor), Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogensis: American Society for Microbiology, 1992; 445-454.

(32)Miller J, Kassem S, Pepper SD, Hey Y, Ward TH, Margison GP.Mycoplasma Infection Significantly Alters Microarray Gene Expression Profiles.Biotechnique E,Etal.,Editors. Encyclopedia of Cell Technologs, 2003; 35(4):812-814.

(33)Molla Kazemiha V, Shokrgozar MA, Arabestani MR, Shojaei Moghadam M, Azari SH, Maleki S, Amanzadeh A,

www.SID.ir

Archive of SID
Jeddi Tehrani M, Shokri F. PCR-Based Detection and Eradication of Mycoplasmal Infections from Various Mammalian Cell Lines: a Local Experience. Cytotechnology, 2009; 61:117-124.

(34)Molla Kazemiha V, Azari SH, Amanzadeh A, Bonakdar S, Shojaei Moghadam M, Habibi Anbouhi M, Maleki S, Ahmadi N, Mousavi T, Shokrgozar MA .Efficieny of Plasmocin™ on Various Mammalian Cell Lines Infected by Mollicutes in Comparison with Commonly Used Antibiotics in Cell Culture: a Local Experience. Cytotechnology, 2011; 63(6):609-620.

(35)Peredeltchouk M, Wilson David SA,Bhattacharya B, Volokhov DV, Chizhikov V.Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Substrates Using Reverse Transcription-PCR Assays.J Appl Microbiol, 2011;110(1):54-60.

(36)Polak-Vogelzang AA, Brugman J, Reijgers R.Comparison of Two Methods for Detection of Mollicutes (Mycoplasmatales and Acholeplasmatales) IV Cell Cultures in the Netherlands. Antonie Van Leewenhoek, 1987; 53 (2):107-118.

(37)Rawadi G, Dussurget O.Advanced in PCR-Based Detection of Mycoplasmas Contaminating Cell Cultures.PCR Methods Appl, 1995; 4:199-208.

(38)Razin S, Yogev D, Naot Y.Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev, 1998; 62: 1094-1156.

(39)Razin S.DNA Probes and PCR in Diagnosis of Mycoplasma Infection.Mol Cell Probes, 1994; 8:497-511.

(40)Robinson LB, Wichelhausen RH.Contamination of Human Cell Cultures by Pleura Pneumonia Like Organisms (PPLO). Science, 1956; 124:1147-1148.

(41)Rottem S, Barile MF.Beware of Mycoplasmas.Trends Biotechnol, 1993; 11:143-51.

(42)Rottem S.Interaction of Mycoplasmas with Host Cells.Physiol Rev, 2003; 83: 417-432.

(43)Roulland-Dussoix D, Henry A, Lemercier B.Detection of Mycoplasmas in Cell Cultures by PCR: a One Study. Elsevier Journal, 1994; 19(2):127-134.

(44)Smith A, Mowles J.Prevention and Control of Mycoplasma Infection of Cell Cultures.In: Tully JG, Razin S (Editors), Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology.San Diego, Academic Press, 1996; 445-451.

(45)Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-Based Detection of Mycoplasma Species. J Microbiol, 2006; 44:42-49.

(46)Stormer M,Vollmer T,Henrich B, Kleesiek K, Dreier J.Broad-Range Real-Time PCR assay for the Rapid Identification of Cell-Lines Contaminants and Clinically Important Mollicute Species.Int J Med Microbiol ,2009;299:291-300.

(47)Tang J,HU M,Lee S,Robin RA.Polymerase Chain Reaction Based Method for Detecting Mycoplasma/Acholeplasma Contaminants in Cell Culture. J Microbiol Methods, 2000; 39: 121-126.

(48)Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E .Detection of Multiple Mycoplasma Infection in Cell Cultures by PCR.Braz J MED Biol Res, 2006; 39:907-914.

(49)Tully JG.Diagnosis of Mycoplasma Infections of Cell Cultures.Introductory Remarks.In: Tully JG, Razin S, Editors. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology.Diagnostic Procedures. San Diego, Academic Press, 1996; 405-410.

www.SID.ir

Archive of SID
(50)Uphoff CC, Drexler HG.Detection of Mycoplasma in Leukemia-Lymphoma Cell Lines Using Polymerase Chain Reaction. Leukemia, 2002a; 16:289-293.

(51)Uphoff CC, Drexler HG.Comparative Antibiotics Eradication of Mycoplasma Infections from Continuous Cell Lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim.2002b; 38(2):86-89.

(52)Uphoff CC, Drexler HG.Comparative PCR Analysis for Detection of Mycoplasma Infections in Continuous Cell Lines.In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002c; 16:89-93.

(53)Uphoff CC, Merkhoffer Y, Drexler HG.A New Method for the Rapid Detection of Mycoplasma Contaminations in Leukemia Cell Lines. Hematol J, 2003; 4(2):16-18.

(54)Uphoff CC, Drexler HG.Detecting Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction. Methods Mol Med, 2004; 88:319-26.

(55)Uphoff CC, Drexler HG.Detection of mycoplasma contaminations.In: Helgason CD, Miller CL, Editors. Basic Cell Culture Protocols: Methods in Molecular Biology, 2005; 290(3)13-23.

(56)Uphoff CC, Drexler HG. Detection Mycoplasma Contamination Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction. Methods Mol Biol, 2011; 731:93-103.

(57)Van Kuppeveld FJ, Van der Logt JT, Angulo AF, Van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, etal.Genus- and Species-Specific Identification of Mycoplasmas by 16SrRNA Amplification.Appl Environ Microbiol, 1992; 58:2606-2615.

(58)Van Kuppveld FJ, Johansson KE, Galama JM ,Kissing J,Bolske G, Van der Logt JT,Etal.Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Mycoplasma Group-Specific PCR.Appl Environ Microbiol, 1994;60:149-52.

(59)Volokhov DV,Kong H, George J, Anderson C, Chizhikov VE.Biological Enrichment of Mycoplasma Agents by Co Cultivation with Permissive Cell Cultures. Appl Environ Microbiol 2008; 74:5383-5391.

(60)Waites KB, Talkington DF.Mycoplasma Pnemoniae and its Role as a Human Pathogen. Clin Microbiol Rev, 2004; 17:697-728.

(61)Waites KB, Brenda K, Schelonka RL.Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens.Clin Microbiol Rev, 2005; 18: 757-789.

(62)Yavlovich A, Kohen R, Ginsburg I, Rottem S.The Reducing Antioxidant Capacity of Mycoplasma fermentans.FEMS Microbiol Lett , 2006; 259:195-200.

(63)Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR.Detection of Mycoplasma in Cell Cultures.Nat Protoc.2010; 5(5):929-934.

(64)Zhang S, Tsai S, Lo SC.Alteration of Gene Expression Profiles During Mycoplasma-Induced Malignant Cell Transformation. BMC Cancer, 2006; 6:116.

(65)Zhi Y, Mayhew A, Seng N, Takle GB.Validation of PCR Method for the Detection of Mycoplasmas According to European Pharmacopoeia Section. Biologicals, 2010; 38:232-237.

www.SID.ir