مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

توسعه یک روش PCR جهت تشخیص آلودگی های مایکوپلاسما در رده های سلولی و فراورده های بیولوژیکی

مهدیه سادات غیاثی*[۱و۲]، محمد حسن شاه حسینی[۳و۴]، حمید رضا مهاجرانی[۱]

۱) دانشگاه علوم تحقیقات اراک، گروه میکروبیولوژی، اراک-ایران
۲)دکتری تخصصی فیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد واحد شهر قدس
۳)دکتری تخصصی فیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات اراک
۴) موسسه ایرانیان ژن فناور، تهران- ایران

Archive of SID

چکیده

سابقه و هدف :آلودگی لاین های سلولی و فراورده های بیولوژیکی یکی از مشکلات عمده تکنیک کشت سلولی می باشد. تشخیص سریع ودقیق آلودگی مایکوپلاسما قسمت مهمی از کنترل آزمایشگاه های کشت سلول است، وباید روشی در هر آزمایشگاه کشت سلول وجود داشته باشد. سلول های آلوده منتهی به نتایج غیر قابل اطمینان می شود، بنابراین نیاز به یک روش مطمئن در آزمایشگاه امری ضروری می باشد. واکنش زنجیره ای پلیمراز یک تکنیک سریع، حساس و با ویژگی بالا در تشخیص باکتریها به شمار می رود. هدف از این مطالعه بررسی کارآیی PCR در شناسایی آلودگیهای کشت سلول و سایر فرآورده های بیولوژیک است.

روش کار: در این مطالعه ابتدا تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای MGSO و GPO-1 و هدف ژنی ۱۶SrRNA بهینه گردید. همچنین روش PCR مورد استفاده از لحاظ حساسیت و ویژگی بررسی گردید. سرانجام DNA به روشی ساده از ۷۲ لاین سلولی استخراج و با PCR آزمایش شد.

یافته ها: محصول ۷۱۵ جفت بازی توسط پرایمرها تکثیر و از طریق تعیین توالی تائید گردید. در بررسیهای ویژگی، با هیچکدام از DNA های تست شده محصولی تکثیر نشد. این روش دارای حساسیتی در حد ۱۰ کپی از ژنوم هدف بوده و با DNA میکروارگانیسم های دیگر، آمپلیکون ناخواسته ای مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج حاصله از این مطالعه مشخص می کند که این روش مولکولی در تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کشت های سلولی و فراورده های بیولوژیک از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار می باشد.

کلمات کلیدی: مایکوپلاسما، پی سی آر، آلودگی، تشخیص مولکولی، کشت سلول

مقدمه:

مایکوپلاسماها متعلق به کلاس Mollicutes و یکی از کوچکترین میکروارگانیسم های زنده آزاد و توانا درخود تکثیری هستند. این باکتریها از جدیترین آلوده کننده های کشت سلول، فراورده های بیولوژیک ومخرب نتایج بیولوژیک به شمار می آیند. (۶،۲۰،۲۸ ،۱)همچنین فاقد دیواره سلولی و شامل فقط یک غشای سلولی، ریبوزومها، وژنومی به اندازه ۵۸۰ kb می باشند. به دلیل سایز کوچک، مایکوپلاسماها می توانند از فیلترهای ۰/۲۲ و µm ۰/۴۵ عبور کنند، فیلترهایی که به طور معمول برای استریل کردن معرف های کشت سلول استفاده می شود.(۱۴،۲۶) . مایکوپلاسماها اغلب آلوده کننده هایی با رشد

آدرس نویسنده مسئول : خیابان بنیاد، مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم، آزمایشگاه سلول های بنیادی
Email :Mahdieh.ghiasi@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۸/۲۳
تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱

www.SID.ir

آهسته می باشند که به طور معمولی به تعداد کم وجود دارند، اما ممکن هست باعث ایجاد مشکلاتی در کشت سلول شوند. آلودگی مایکوپلاسمایی نشان داده شده است که سرعت رشد سلولی، متابولیسم امینواسیدی و نوکلئیک اسید، آنتی ژنیسیته سلولی را تغییر می دهد، و به علاوه باعث نقص کروموزومی وتغییرات غشایی می شود (۳،۱۴،۲۱،۲۶،۲۷). منشا آلودگی بیشترکشت های سلولی حیوانی، مایکوپلاسماها شناخته شده اند (۱۵). آلودگی کشت های سلولی با مایکوپلاسماها مشکلی هست که در میان بیشتر آزمایشگاه های کشت سلول دیده می شود. آلودگی ممکن است برای مدت طولانی ناشناخته باقی بماند، و تکثیر سلول، بیان ژن، و پاسخ های دیگر سلول را تحت تاثیر قرار دهد. شناسایی آلودگی قسمت مهمی از کنترل کیفی آزمایشگاه های کشت سلول می باشد (۲۶). آلودگی های مایکوپلاسما در کشت های سلولی مورد استفاده در امر تحقیقات مشکلات بسیاری را ایجاد می نمایند. در بیشتر نمونه ها شناسایی چشمی این آلودگی یا شناسایی میکروسکوپی آن غیر ممکن هست. اگر چه مایکوپلاسما آسیب قابل مشاهده ای را در سلول ها سبب نمی شود، اما مسلما متابولیسم سلولی، رشد سلول در محیط کشت ، سنتز پروتئین، ترشح سایتوکان، را تحت تاثیر قرار می دهد و حتی باعث آسیب رساندن به DNA و RNA می گردد. مطالعات مختلف نشان می دهد که درصد کشت های آلوده شده در بانک های سلولی بین ۱۰٪ تا ۸۵٪ می باشد. آلودگی مایکوپلاسما می تواند از سرم گاوی، پرسنل آزمایشگاه، کشت های آلوده دیگر، یا از حیواناتی که سلول ها از آنها گرفته شده است، قابل انتقال باشد(۲۰،۲۹). بیشترگونه های مایکوپلاسما که در کشت های سلولی آلوده شناسایی شده اند عبارتند از: مایکوپلاسما فرمنتانس (*Mycoplasma fermentans*)، مایکوپلاسما هیورینیس (*Mycoplasma hyorinis*)، مایکوپلاسما آرجنینی (*Mycoplasma arginini*)، مایکوپلاسما ارال(*Mycoplasma orale*) ، اکولپلاسما لیدولای (*Achoplasma laidlawi*) (۸،۲۲،۳۰).

شناسایی مایکوپلاسما می تواند توسط روش های کشت مستقیم ارگانیسم و روش های غیر مستقیم انجام پذیرد (۵،۲۳). روشهای غیر کشتی شامل : ۱) رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلورسنت ۲) دو رگه سازی اسید نوکلئیک ۳) تستهای بیوشیمیایی و ۴) واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR می باشد (۵،۸،۲۰،۲۲،۲۹). واکنش زنجیره ای پلیمراز یک روش بسیار حساس بوده و تکنیک مناسبی جهت تشخیص مایکوپلاسما در کشت سلول می باشد. مقایسه روش PCR با دیگر روشها (هیبریدیزاسیون DNA/RNA و کشتهای میکروبی) مشخص می کند که روش PCR یک متد سریع و قابل اعتماد برای شناسایی مایکوپلاسما هست (۲۶،۲۷). یکی از مراحلی که در تکنیک PCR از اهمیت ویژه ای برخوردار است ژن هدف و تعیین سکانس پرایمرها می باشد. در بیشتر روش های PCR ، سکانس های ۱۶ SrRNA به عنوان سکانس های الگو استفاده می شود زیرا که این ژن دارای مناطقی با ترادف های حفظ شده و مشترک در بین مایکوپلاسماها می باشد (۹،۱۳،۱۷،۲۴). هدف این مطالعه شناسایی جنس مایکوپلاسما در نمونه های کشت سلولی و نیز فراورده های بیولوژیکی از طریق روش مولکولی بر پایه PCR و سکانسهای ثابت ۱۶ SrRNA می باشد.

مواد و روش ها:

سویه های باکتریایی مورد استفاده :

در این مطالعه گونه های متعلق به مولیکوت ها بکار رفته است که عبارتند از مایکوپلاسما پنومونیه(۱۰۱۱۹ NCTC) ، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورینیس ، مایکوپلاسما ارال ، مایکوپلاسما سینوویه، مایکوپلاسما گالیناروم(رازی ۱۳۵۰و۱۳۴۶) ، مایکوپلاسما گالیسپتیکوم (رازی ۱۳۵۵) ، مایکوپلاسما اویاپنومونیه(رازی ۱۳۶۴) ، مایکوپلاسما آگالاکتیا(رازی ۱۳۴۳) ، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم(رازی ۱۳۶۹) و اکولو پلاسما لیدلاوی .

تهیه نمونه ها:

کشتهای سلولی مورد استفاده در این مطالعه از آزمایشگاه سلول های بنیادی جهاد دانشگاهی واحد قم تهیه شده است. ۷۲ نمونه شامل رده های سلولی انسانی (سلول های مزانشیمال و سلولهای خونساز) و اجزاء محیط کشت از جهت آلودگی به

Archive of SID

www.SID.ir

مایکوپلاسما بررسی شده اند.

استخراج DNA

از روش جوشاندن جهت استخراج DNA استفاده شده است. به این ترتیب که ۱۰۰ µl از سوسپانسیون سلولی به همراه روغن معدنی در حرارت جوش قرار داده شد و پس ازسانتریفوژ در g ۱۲۰۰۰، مایع رویی بعنوان الگو در تست PCR مورد استفاده قرار گرفت (۲۵).

سکانس نوکلئوتیدی پرایمرها

سکانس پرایمرها مورد استفاده به شرح زیر می باشند:

	Sequence(5'------3)
GPO-1	5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCATAG-3′
MGSO	5′-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3′

شرایط PCR

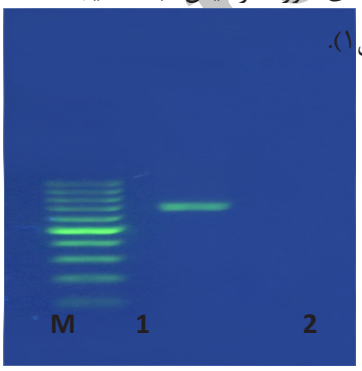
ترکیبات لازم جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر به ترتیب زیرتهیه گردید. ۵ میکرولیتر از DNA الگو (template) ، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای جلویی و عقبی ، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X) (سیناکلون) ، ۰/۷۵میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰ mM (سیناکلون)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰mM) (سیناکلون) و ۰/۴ میکرولیتر ازآنـــــزیم Taq (سیناکلون) و ۱۴ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل دیونیزه جهت به حجم رساندن استفاده گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده و اپتیمایز شده عبارت بود از: حرارت ۹۳ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه ، ۶۰ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه، و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه که طی ۴۰ سیکل عمل تکثیر انجام گردید. محصول PCR با سایز مورد نظر (۷۱۵ جفت باز)، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، برروی ژل آگاروز ۱/۵ ٪ درصد و با استفاده از اتیدیوم برو مایدو نور UV در دستگاه ترانس ایلومینیتور بررسی گردید.

حساسیت و ویژگی آزمون:

جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون از سوسپانسیون مایکوپلاسما آرجنینی با CFU مشخص، رقت های مختلفی تهیه و DNA آنها استخراج و در نهایت آزمون PCR بر روی نمونه های واجد تعداد مشخص انجام شد.آزمون ویژگی هم با استفاده از DNA تعدادی از ارگانیسمها مانند انسان، موش، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سودوموناس آئروجینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس انجام پذیرفت.

یافته ها:

در این مطالعه تعداد ۷۲ نمونه شامل رده های سلولی انسانی (مزانشیمال و خونساز) و اجزاء محیط کشت بررسی شد، که در ۸/۵٪ از نمونه های مورد بررسی (۶ مورد) آلودگی با مایکوپلاسما مشخص گردید. با تست بررسی حساسیت آزمون نشان داده شد که پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه دارای حساسیتی برابر ۱۰ CFU و از ویژگی بالایی برای شناسایی مایکوپلاسماها برخوردار می باشند. بکار بردن روش جوشاندن جهت استخراج DNA بجای کیت های تجاری از مزایای دیگر این تحقیق می باشد، که روشی سریع و ساده است و با امکانات پایین و انجام پذیر می باشد. با استفاده از پرایمرهایGPO-۱,MGSO و DNA انواع مایکوپلاسماها مانند مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما آرجنینی، مایکوپلاسما هیورونیس، مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما لیدولای، اوره آپلاسما اوره الیتیکوم، تکنیک PCR بهینه سازی گردید. این تست PCR با DNA تمام مایکوپلاسماهای مورد آزمایش، باعث ایجاد محصول ۷۱۵bp گردید (شکل۱).

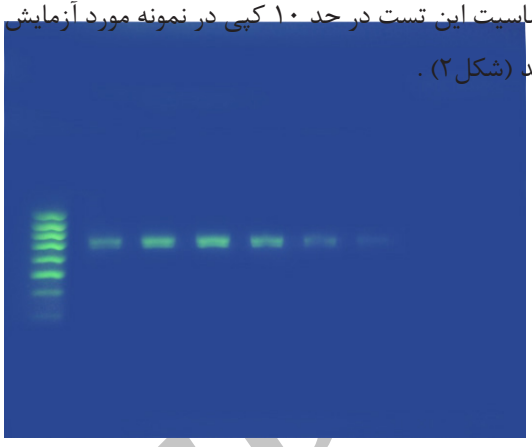


شکل ۱. تست بهینه سازی شده PCR با استفاده از پرایمرهای-GPO ۱,MGSO : ستونM سایز مارکر ۱۰۰bpDNA Ladder (فرمنتاس)، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲ کنترل منفی (آب مقطر)(آگارز۱/۵٪ و

www.SID.ir

بافر TBE ۰.۵X).

ارزیابی حساسیت آزمون از طریق رقیق سازی کشت مایکوپلاسما با واحد سازنده کلنی مشخص انجام پذیرفت. نشان داده شد که حساسیت این تست در حد ۱۰ کپی در نمونه مورد آزمایش می باشد (شکل۲) .



M 1 2 3 4 5 6 7 8

شکل۲. تست بررسی حساسیت آزمون PCR بهینه شده: ستون M سایز مارکر ۱۰۰ bp DNA Ladder (فرمنتانس)، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲ 10^6 CFU ، ستون ۳ 10^5 CFU ، ستون ۴ 10^3 CFU ، ستون ۵ ۱۰۰ CFU ، ستون۶ ۱۰ CFU ، ستون ۷ ۱ CFU ، ستون ۸ کنترل منفی (آگارز۱/۵٪ و بافر TBE ۰.۵X).

با انجام آزمون ویژگی، مشخص گردید که پرایمرهای مورد استفاده هیچ محصول ناخواسته ای با DNA باکتریهای غیر مایکوپلاسمایی مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ، سودوموناس، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و همینطور DNA انسان و موش ایجاد نکردند (شکل۳).

M 1 2 3 4 5 6 7 8
8888888 8

شکل ۳ . تست آزمون ویژگی PCR بهینه شده. ستون M: سایز مارکر ۱۰۰ bp DNA Ladder (فرمنتانس)، ستون۱: کنترل مثبت (DNA مایکوپلاسما آرجنینی)، ستون ۲: DNA انسان، ستون ۳: DNA موش، ستون ۴: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ستون۵: سودوموناس آئروجینوزا، ستون۶: استافیلوکوکوس اورئوس، ستون ۷: سالمونلا تیفی، ستون ۸: کنترل منفی (آگارز۲٪ و بافر TBE۰.۵X)

آلودگی مایکوپلاسما در ۷۲ نمونه شامل رده های سلولی مختلف (رده های مزانشیمال و خونساز) و اجزاء محیط کشت بوسیله PCR مخصوص جنس جستجو شد. از این تعداد، ۶ نمونه آلوده(۸/۵٪)، از طریق تکثیر قطعه صحیح، تشخیص داده شد.

بحث

مایکوپلاسماها از ارگانیسم های غیر قابل رویت با میکروسکوپهای نوری و همچنین کوچکترین باکتریهای خودتکثیر پلئومورف، با قطری حدود ۵۰۰-۲۰۰ نانومتر، و فاقد دیواره سلولی می باشند. بدلیل داشتن اندازه کوچک و ویژگی انعطافی، این باکتریها از سوراخ فیلترهای ۲۲۰ و ۴۵۰ نانومتری که برای کشت سلول استفاده می شود بسادگی عبور کرده و بدین ترتیب باعث آلودگی کشت های سلولی می گردند. این ارگانیسم ها از مهمترین عوامل آلوده کننده کشت سلول به شمار می روند. تغییرات بیوشیمیایی و ژنتیکی از جمله مشکلاتی هستند که توسط مایکوپلاسما های آلوده کننده کشت سلولی ایجاد، و این مشکلات منتج به نتایج غیر قابل اعتماد در روند تحقیقات می گردد (۹،۱۰،۱۹) . شناسایی این عوامل آلوده کننده با روش های بیوشیمیایی، سرولوژی، رنگ آمیزی با رنگ های فلوروکروم (رنگ هوخست و DAPI)، کشت در محیط های کشت و روش های مولکولی قابل انجام می باشد (۱۰،۱۹). روشهای مختلفی برای تشخیص مایکوپلاسما در کشت سلول و فرآورده های بیولوژیک به کاربرده می شود. در بسیاری از مطالعات از ترکیب دو روش جهت شناسایی مایکوپلاسما در کشت سلولی استفاده می شود تا نتایج کاذب را به حداقل برسانند. PCR همراه با کشت به طور بسیار گسترده بکار برده شده است، که قادر به تشخیص نمونه های آلوده می باشند (۹،۱۳،۲۳). همچنین در مطالعه ی دیگری از دو تکنیک کشت و رنگ آمیزی DNA استفاده شده است. روش کشت روشی وقت گیر و دارای نتایج منفی کاذب زیاد و روش رنگ آمیزی DNA هم تفسیر نتایج بدست آمده از آن به دلیل آلودگی باکتریایی

Archive of SID

www.SID.ir

مشکل می باشد (۱،۲،۱۶،۲۶،۲۸). از میان تکنیک های بکار برده شده در تشخیص مایکوپلاسما که شامل روش مولکولی PCR ، روش های رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلوروکروم و بیوشیمیایی است، مشخص شده است که تکنیک PCR روشی حساس، سریع و با ویژگی بالا می باشد (۲) روش های کشت میکروبی به زمان ۴-۱ هفته ای در آزمایشگاه نیازمند هستند. در ضمن هنوز تعدادی از سویه های مایکوپلاسما وجود دارند که در کشت های میکروبی غیر قابل رشد و یا به سختی مانند مایکوپلاسما هیورونیس رشد می کنند(۲). داشتن یک روش سریع و حساس برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کشت سلول و فرآورده های بیولوژیک از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. این روش باید توانایی شناسایی ۵ گونه تیپیک مایکوپلاسماهای آلوده کننده کشت سلول را داشته باشد که شامل مایکوپلاسما هیورونیس، مایکوپلاسما آرجنینی، مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما فرمنتانس، اکولوپلاسما لیدولای هستند که عامل بیش از ۹۵٪ آلودگی ها در کشت سلولی و فرآورده های بیولوژیک می باشند. وبه علاوه باید قادر به شناسایی سایر گونه های آلوده کننده نیز باشند.

در این مطالعه سعی شده است با استفاده از روشی مولکولی و حساس، به شناسایی مایکوپلاسماهای آلوده کننده کشت های سلولی و فرآورده های بیولوژیکی پرداخته شود. نتایج حاصل از این مطالعه، تاییدی بر این موضوع هست که سکانس های ثابت و مشترک ۱۶SrRNA موجود در مایکوپلاسماها، به عنوان یک هدف ژنی مناسب جهت تشخیص این آلوده کننده ها در کشت های سلولی و محصولات بیولوژیکی می باشند.

هدف اصلی از این بررسی رسیدن به یک روش قابل اعتماد و سریع جهت شناسایی مایکوپلاسما در کشت های سلولی و نیز در سرم های حیوانی و فراورده های بیولوژیک است. در این مطالعه که بر مبنای واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) طراحی گردید توانستیم به حداقل حساسیت ۱۰ کپی از مولکول DNA هدف رسیده و همچنین هیچ واکنش متقاطعی با DNA ژنومیک دیگر ارگانیسم های مورد آزمایش مثل سودوموناس ائروجینوزا، انسان، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و استافیلوکوکوس اورئوس دیده نشد. اما در بعضی مطالعات حد شناسایی بین ۱-۱۰۰ مایکوپلاسما می باشد، که با توجه به گونه مایکوپلاسمای بررسی شده، نوع و طراحی پرایمر، هدف ژنی و شرایط PCR متفاوت است(۴،۷،۱۲،۲۱). بدین ترتیب بخش های ثابت و مشترک ژن ۱۶ SrRNA را به عنوان سکانس هدف انتخاب گردید. گزینش این سکانس به دلیل تکرر آن در طول ژنوم و نیز ثابت و مشترک بودن آنها در بین اعضاء مولیکوت ها هست. از دیگر ویژگی های این مطالعه روش استخراج DNA می باشد، که به روش ساده جوشاندن انجام پذیرفته است. این روش بدلیل سادگی، سریع بودن و زمان کم و علاوه بر آن عدم استفاده از مواد شیمیایی مثل فنل- کلروفرم و مواد دیگر جهت استخراج DNA ، از ویژگیهای منحصر بفردی برخوردار است. آلودگی مایکوپلاسما یکی از فاکتورهای مهم تحدید کننده کشت سلول و فراورده های بیولوژیک می باشد، که ویژگی های بیولوژیکی سلول را تحت تاثیر قرار می دهد. از این رو بکاربردن روشی مناسب برای شناسایی مایکوپلاسماها بسیار مهم است. زیرا روش های مرسوم به علت محدودیت از نظر صرف وقت زیاد، حساسیت کم و داشتن مهارت، دارای ویژگی های لازم جهت تشخیص مایکوپلاسماها در کشت سلول و فرآورده های بیولوژیکی نمی باشند. اما روش های مولکولی بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) به دلیل ویژگی های ذاتی آن از اهمیت بسزایی برخوردارند. نتایج مشاهده شده در این مطالعه مبتنی بر دقت و سرعت و حسایت و ویژگی بالای تکنیک PCR بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک در ۱۶SrRNA جهت تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کشت سلول و فراورده های بیولوژیک می باشد .

سپاسگزاری:

از مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم و آزمایشگاه کشت سلول و بانک خون بند ناف جهاد دانشگاهی قم جهت همکاری کمال تشکر را دارم.

منابع :

[1] Barile MF Mycoplasma-tissue cell culture

Archive of SID

www.SID.ir

interactions.In:The Mycoplasmas (Tully GJ, Whitcomb RF,eds.). Academic Press, New York, 1979,425–474
[2] Been-Abdelmoumen B, Roy RS Antigenic relatedness between seven avian Mycoplasma species as recovered by western blot analysis. Avian Dis, 1995, 39, 250–262
[3] Bonissol C, TraincardF, Stoiljkovic B, Hosli P Adenosine phosphorylase activity as a technique for detection of Mycoplasmas in biological media. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1984.135A, 63–72.
[4] Buck GE, Ohara LC, Summersgill JT Rapid sensitive detection of Mycoplasma pneumoniae in simulated clinical specimens by DNA amplification. J Clin Microbiol, 1992.30, 3280–3283
[5] Dussurget O, Dussiox DR Rapid and sensitivePCR-based detection of Mycoplasmas in simulated samples of animal sera. Appli Environ Microbiol, 1994,60, 953– 959
[6] Eldering JA, Felton C, Veillux A, Potts BJ Development of a PCR method for Mycoplasma testing of chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. Biologicals, 2004,32,183–193.
[7] Grau O,KovacicR, Griffais R,Montagnier L Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of Mycoplasma pirum. FEMS Microbiol Lett, 1993.106, 327–334.
[8] Hart MK,Delgiudice RA,Korch GW Absence of Mycoplasma contamination in the anthrax vaccine. Emerg Infect Dis, 2002.8, 94–96.
[9] Harasawa R,Mizusawa H,Nozawa K, Nakagawa T, Asada K Detection and tentative identification of dominant Mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. Res Microbiol, 1993.144, 489–493.
[10] Harasawa R Nested PCR: Application to the detection of Mycoplasmas. In: Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology (Razin, S. and Tully, J.G., eds.). Academic Press London ,1995,235–250.
[11] Jurmanova K,Hajkova M,Fischer O
Detection of Mycoplasmas in cell cultures. Zent Bakteriol Parasit Infekt. 1990,20, 947–948.
[12] Kai M,Kamiya S, Yabe H, Takakura I, Shiozawa K Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol,1993,38, 166–170.
[13] Kong F,James G,Gordon S, Zelynski A,Gilbert GL Species-specific PCR for identification of common contaminant Mollicutes in cell culture. Appl Environ Microbiol, 2001, 67, 3195–3200.
[14] Loens K,Uris D,Goossens H,Ieven M Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. J Clin Microbiol, 2003,41, 4915–492
[15] Mardassi BB, Mohamad RB,Gueriri I, Boughattaas S,Mlik B 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, 2005,43, 948–958.
[16] McGarrity GJ,Kotani H,Butler GH Mycoplasmas and tissue culture cells. In: Manillof, J., Mcelhaney, N., Finch, L.R. and Baseman, J.B, Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis. Am Soc Microbiol, 1992,445–454.
[17]Quirk JT,Kupinski JM,Dicioccio RA Detection of Mycoplasma ribosomal DNA sequences in ovarian tumors by nested PCR. Gynecol Oncol, 2001,83, 560–562.
[18]Rawadi Gd,Dussurget O Advances in PCRbased detection of Mycoplasmas contaminating cell cultures. PCR methods Appl,1995,4, 199–208.
[19]Razin S DNA probes and PCR in diagnosis of Mycoplasma infections. Mol Cell Probes, 1994,8, 497–511.
[20]Sung Hb,Kang SH,Bae YJ,Hong JT, Chung YB PCR-based detection of Mycoplasma species. J Microbiol, 2006,44, 42–49.
[21]Spaepen M,Angulo AF,Marynen P,Cassiman JJ Detection of bacterial and Mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett,1992, 99, 89–94.
[22]Spergser J,Rosengarten R Identification and differentiation of canine Mycoplasma isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. Vet Microbiol, 2007,125, 170–174.
[23]StakenborgT, Vicca J,Verhelst R,Butaya P,Maes D Evaluation of tRNA gene PCR for identification of Mollicutes. J Clin Microbiol, 2005,43, 4558–4566.
[24] Tang J,Hu M,Lee S, Robin RA Polymerse chain reaction based method for detecting Mycoplasma/ Acholeplasma contaminants in cell culture. J Microbiol Methods, 2000, 39, 121–126.
[25]Timenetsy 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
[26]Uphoff CC,Brauer S,Grunicke D,Gignac SM,Macleod R Sensitivity and specificity of five different Mycoplasma detection assays. Leuk Res, 1992, 6, 335–341.
[27] Uphoff CC,Drexler HG Comparative PCR analysis for detection of Mycoplasma infections in continuous cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2002,38, 79–85.
[28] Van-kuppeveld FJ,Van-der-logt JT, Angulo AF,Van-Zoest MJ,Quint WGGenus- and speciesspecific identification of Mycoplasmas by 16S Rrna amplification. Appl Environ Microbiol,1992,58, 2606–2615.
[29]Wang H,Kang F,Jelfs P,James G,Gilbert GLSimultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mollicutes strain by reverse line blot hybridization. Appli Environ Microbiol,2004,70,1483–1486.
[30] Woubit S, Manso-Silvan L, Lorenzon S,Gaurivaud P,Poumarat F A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the Mycoplasma mycoides cluster: Application to the diagnosis of contagious agalactia. Mol Cell Probes,2007,21, 391–399.

Archive of SID

www.SID.ir