مقاله پژوهشی
مجله دانشکده پزشکی اصفهان
تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۳
سال بیست و هشتم/شماره ۱۲۱/هفته اول اسفند ماه ۱۳۸۹

مقایسه‌ی روش‌های کشت میکروبی و PCR در تعیین آلودگی رده‌های سلولی به مایکوپلاسما

محمد رضا عربستانی[۱]، دکتر حسین فاضلی[۲]، دکتر محمود جدی تهرانی[۳]، دکتر فاضل شکری[۴]

خلاصه

مقدمه: مایکوپلاسماها از آلوده‌کنندگان اصلی رده‌های سلولی هستند که به عنوان مشکل عمده‌ی اقتصادی و بیولوژیکی در زمینه‌های تحقیقات پایه، تشخیص و فرآورده‌های بیوتکنولوژی در نظر گرفته می‌شوند. تشخیص مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی ابتدا به وسیله‌ی کشت میکروبی آغاز شد و سپس رنگ آمیزی DAPI و آزمایش‌های سرولوژی از قبیل آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، آزمایش DNAprobe، PCR-ELISA، PCR و Real-Time PCR برای شناسایی مایکوپلاسما توسعه یافت. در این مطالعه به بررسی آلودگی رده‌های سلولی مختلف موجود در بانک سلولی ایران با میکوپلاسما پرداختیم.

روش‌ها: در این مطالعه، یک روش سریع حساس اختصاصی برای تشخیص گونه‌های مختلف مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی مورد استفاده قرار گرفت. این روش بر اساس واکنش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس ۱۱ گونه‌ی مختلف مایکوپلاسما انجام گرفت.

یافته‌ها: از ۱۸۳ رده‌ی سلولی مختلف موجود در بانک سلولی مورد بررسی با روش PCR ۴۸/۶ درصد رده‌های سلولی آلودگی به مایکوپلاسما را نشان داد؛ در حالی که با روش کشت میکروبی ۲۷/۳ درصد از رده‌های سلولی آلودگی به مایکوپلاسما را نشان دادند. نتایج به دست آمده توسط روش PCR در مقایسه با روش کشت میکروبی حساسیت ۱۰۰ درصد و ویژگی ۷۰/۷ درصد را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه‌های مختلف مایکوپلاسما نشان داد که مهم‌ترین و عمده‌ترین گونه‌های آلوده کننده‌ی رده‌های سلولی به ترتیب اهمیت آلودگی شامل مایکوپلاسما فرمانتانس، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیوراینیس و مایکوپلاسما اورال بودند. این مطالعه همچنین نشان داد که برخی از رده‌های سلولی با بیش از یک گونه مایکوپلاسما آلوده بودند.

واژگان کلیدی: مایکوپلاسما، رده‌های سلولی، کشت میکروبی، PCR

مقدمه

مایکوپلاسما کوچک‌ترین میکروارگانیسم زنده با اندازه‌ای حدود ۸۰۰ – ۳۰۰ نانومتر است. این میکروارگانیسم پلئومرف دیواره‌ی سلولی ندارد و دارای تکثیر خود به‌خودی است. مایکوپلاسماها جزء رده‌ی مولیکوت‌ها (Mollicutes) و راسته‌ی تنریکوت‌ها (Tenricutes) طبقه‌بندی می‌شوند (۲-۱). مایکوپلاسماها آلوده‌کنندگان اصلی و عمده‌ی رده‌های سلولی (Cell lines) در سراسر دنیا هستند که به عنوان یک مشکل اصلی اقتصادی و بیولوژیکی در زمینه‌ی تحقیقات تشخیص و فرآورده‌های بیولوژیکی قلمداد می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که ۵ تا ۸۷ درصد از رده‌های سلولی به مایکوپلاسماها آلوده هستند (۶-۳). بیش‌تر از ۱۲۰ گونه‌ی مولیکوت وجود دارد اما بیش از ۹۵ درصد موارد آلودگی رده‌های سلولی را ۵ گونه از آن‌ها تشکیل می‌دهند (۹-۷).

۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲ استادیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳ استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴ استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: محمد رضا عربستانی
Email: mr_ arabestani@yahoo.com

www.mui.ac.ir

منشأ آلودگی کشت‌های سلولی به مایکوپلاسما از طریق پرسنل آزمایشگاهی و سرم تجارتی حیوانات که در محیط‌های کشت مورد استفاده قرار می‌گیرند، است (۱۰).

روش‌های تشخیصی زیادی برای شناسایی مایکوپلاسما به کار می‌روند. آزمایش مستقیم شامل کشت میکروبی و آزمایش‌های غیرمستقیم شامل رنگ آمیزی DNA با رنگ‌های فلوروکروم، DNA Probe ELISA ، ایمونوفلورسانس میکروسکوپ الکترونی و ارزیابی‌های بیوشیمیایی می‌باشد (۹،۱۱). اگر چه کوشش در بهبودی این روش‌ها به کار رفته است ولی کماکان تشخیص مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی به عنوان یک مشکل جدی باقیمانده است. به تازگی استفاده از تکنیک‌های Polymerase Chain Reaction(PCR)، PCR-ELISA و Real Time PCR برای شناسایی مایکوپلاسماها توسعه یافته است (۱۴-۱۲). به علت گستردگی و پراکندگی مایکوپلاسما در کشت‌های سلولی یکی از اقداماتی که انجام شده است، درمان رده‌های سلولی آلوده به مایکوپلاسما با آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است که تا حدود زیادی مؤثر بوده‌اند.

در این مقاله از روش PCR به همراه کشت میکروبی جهت بررسی توانایی این روش در تشخیص سریع و دقیق رده‌های سلولی آلوده به مایکوپلاسما، تعیین گونه‌های اصلی مایکوپلاسماهای آلوده‌کننده‌ی رده‌های سلولی و تعیین میزان آلودگی رده‌های سلولی به مایکوپلاسما استفاده شد.

روش‌ها

برای انجام کشت میکروبی از محیط مشکوک به آلودگی به میکوپلاسما ابتدا ۱ الی ۲ میلی‌لیتر نمونه‌ی کشت سلولی که خوب رشد کرده و رنگ محیط را زرد نموده بود، به محیط PPLO-BROTH اضافه شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور دی‌اکسید کربن‌دار و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و سپس به اندازه‌ی ۱ میلی‌لیتر از محیط PPLO-BROTH که در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده بود، برداشته و به محیط PPLO-AGAR اضافه شد و در انکوباتور دی‌اکسید کربن‌دار ودر دمای ۳۷ درجه انکوبه و هر ۲ تا ۳ روز محیط کشت توسط میکروسکوپ نوری اینورت مورد بررسی قرار گرفت.

برای انجام PCR ابتدا DNA مایکوپلاسما را به روش پروتئیناز K استخراج کردیم (۱۴). دو نوع PCR برای تشخیص آلودگی کشت‌های سلولی مورد استفاده قرار گرفت. یک نوع PCR اختصاصی جنس مایکو پلاسما و نوع دیگر PCR اختصاصی گونه‌های آن بود. کلیه‌ی محلول‌های مورد استفاده در دو نوع PCR یکسان بودند، به جز پرایمرهای مورد استفاده که با یکدیگر فرق داشتند. پرایمرها بر اساس توالی ژن SrRNA۱۶ باکتری مایکوپلاسما طراحی شده بودند و برای جداسازی جنس و گونه‌ی مایکوپلاسما به طور اختصاصی عمل می‌کردند. لازم به ذکر است مکان انجام آزمون PCR به طور کامل ایزوله بود و همه‌ی سطوح و میکروپیپت‌ها با الکل صنعتی ۷۰ در صد ضدعفونی شدند. سپس در یک لوله‌ی اپندورف کلیه‌ی مواد لازم جهت انجام PCR مخلوط شد، که این مخلوط، مخلوط اصلی (Master Mix) نامیده شد

www.mui.ac.ir

(مطابق جدول ۱).

جهت انجام PCR عمومی مواد لازم تهیه شده را به Master Mix اضافه کردیم و سپس لوله‌ها را که از قبل مشخصات نمونه بر روی آن‌ها نوشته شده و شامل یک عدد کنترل منفی، یک عدد کنترل مثبت و تعداد نمونه‌هایمان بود در دستگاه ترموسایکلر قرار دادیم تا ژن مربوطه در۳۲ سیکل دمایی(مطابق جدول ۲) تکثیر یابد.

در پایان سیکل ۳۲، مرحله‌ی Extention به مدت ۵ دقیقه‌ی اضافه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ادامه یافت تا تمام زنجیره‌های نیمه تمام کامل شدند.

جهت اجرای PCR اختصاصی گونه‌های مایکوپلاسما، مواد لازم به لوله‌ی اپندورف اضافه شد، سپس طبق روش PCR عمومی ژن مربوطه در ۳۲ سیکل دمایی طبق پروتوکل مندرج در جدول ۳ تکثیر یافت.

پس از اتمام مراحل PCR دستگاه را خاموش کرده و نمونه‌ها را تا زمان آنالیز بر روی ژل آگارز در داخل یخچال نگه‌داری کردیم.

جهت دیدن DNA از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی DNA از محلول اتیدیوم بروماید استفاده شد. سپس ژل آماده شده را داخل تانک الکتروفروز قرار داده و از محلول بافر TBE 1X استفاده کردیم و بعد الکترودهای مثبت و منفی تانک را به منبع تغذیه وصل نموده و سپس دستگاه را روشن کردیم و این فرایند حدود ۳۰-۶۰ دقیقه ادامه پیدا کرد. سپس دستگاه الکتروفروز را خاموش کرده و ژل را بر روی دستگاه ترانس‌لومیناتور قرار داده و از ژل عکس رفتیم.

یافته‌ها

در این مطالعه به منظور بررسی وجود آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی آزمون تشخیصی PCR راه اندازی و سپس بر روی ۱۸۳ رده‌ی سلولی موجود در بانک سلولی انستیتو پاستور ایران مورد بررسی قرار گرفت.

ابتدا DNA مایکو پلاسما به روش پروتئناز K استخراج گردید(شکل ۱).

بعد از استخراج DNA مایکو پلاسما پرایمرهای عمومی و اختصاصی جنس مایکوپلاسما شناسائی شدند که اندازه‌ی محصول آن ۴۲۵ جفت باز بود. در ضمن همین عمل با پرایمرهای اختصاصی گونه‌های مختلف مایکوپلاسما بر روی تعدادی از رده‌های سلولی آلوده و سوش‌های استاندارد مایکو پلاسما انجام شد (شکل ۲).

اندازه‌ی محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه بین ۳۰۰-۳۲۶ جفت باز بود. پس از اثبات کارآئی ویژگی پرایمرهای عمومی جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما تعداد ۱۸۳ رده‌ی سلولی ذخیره شده در بانک سلولی به صورت تصادفی انتخاب و آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی روی DNA انجام شد و تعداد ۸۹ (۴۰درصد) نمونه مثبت و آلوده به مایکوپلاسما بودند. با توجه به مثبت شدن آلودگی رده‌های سلولی به مایکوپلاسما با پرایمرهای عمومی و نیز به دلیل داشتن تنها یک گونه‌ی کنترل مثبت استاندارد مایکوپلاسما اورال پرایمرهای اختصاصی گونه‌ی مایکوپلاسما برای تک‌تک رده‌های سلولی آلوده گذاشته شد و ۸ گونه مورد شنا سائی قرار گرفتند.

www.mui.ac.ir

از مجموع ۸۹ رده‌ی سلولی آلوده به جنس مایکوپلاسما ۷۵ رده‌ی سلولی (۸۳ درصد) با پرایمرهای اختصاصی نیز مثبت شدند. در حین انجام آزمایش PCR اختصاصی گو نه‌های مختلف مایکوپلاسما تعدادی رده‌ی سلولی شناسائی شدند که به طور هم‌زمان به بیش از یک گونه مایکوپلاسما آلوده بودند. از آنجایی که تست استاندارد برای تشخیص آلودگی رده‌های سلولی به مایکوپلاسما کشت میکروبی می‌باشد، جهت تأیید نتایج PCR آزمایش کشت میکروبی مایکوپلاسما بر روی محیط‌های مخصوص مایکوپلاسما انجام گرفت. از ۱۸۳ رده‌ی سلولی مورد آزمایش ۵۰ عدد از رده‌ها با کشت میکروبی مایکوپلاسما مثبت شد و هیچ یک از نمونه‌های مثبت با کشت میکروبی با آزمون PCR منفی نشدند در حالی که تعداد ۳۹ نمونه با کشت منفی، با PCR مثبت شدند.

حساسیت آزمایش PCR در مقایسه‌ی با کشت میکروبی ۱۰۰ درصد بود. بدین مفهوم که تمامی موارد کشت مثبت با PCR نیز قابل تشخیص بودند. از طرف دیگر ویژگی روش PCR در مقایسه‌ی با کشت میکروبی ۷۰/۷ درصد بود. بدین مفهوم که روش PCR در مقایسه‌ی با کشت توانست ۷۱ مورد منفی آن را تشخیص بدهد. به عبارت دیگر می‌توان استنباط نمود که روش کشت ۲۹ درصد موارد منفی کاذب دارد که با روش PCR قابل اندازه‌گیری است.

گونه‌های آلوده‌کننده‌ی کشت‌های سلولی مورد مطالعه طبق جدول ۴ به دست آمدند.

جدول ۱. نوع و مقدار مواد ومحلول‌های مورد استفاده در یک واکنش PCR

محلول	غلظت	حجم مورد استفاده (میکرولیتر)
بافر PCR	۱۰X	۲/۵
dNTP (mM)	۱۰	۱
پرایمر SENSE (µm)	۵	۳
پرایمر Anti SENSE (µm)	۵	۳
پلیمراز DNA (u/µl)	۵	۱
آب مقطر دی‌یونیزه	-	۱۴/۴
DNA نمونه	-	۱
حجم کلی	-	۲۵

جدول ۲. سیکل دمایی اجرای PCR اختصاصی جنس مایکوپلاسما

نام مرحله	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	مدت (ثانیه)
Denaturation	۹۴	۶۰
Annealing	۵۵	۳۰
Extention	۷۲	۶۰

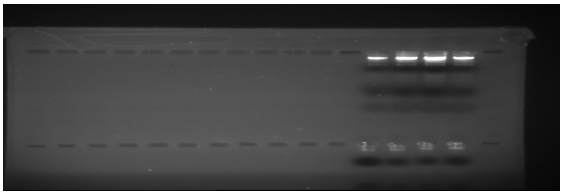
جدول ۳. سیکل دمایی اجرای PCR اختصاصی گونه‌های مایکوپلاسما

نام مرحله	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	مدت (ثانیه)
Denaturation	۹۴	۶۰
Annealing	۶۰	۳۰
Extention	۷۲	۶۰

جدول ۴. گونه‌های مایکوپلاسمای آلوده‌کننده‌ی کشت‌های سلولی مورد مطالعه

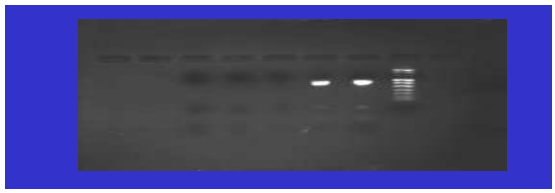
گونه‌ی مایکو پلاسما	فراوانی (درصد)تعداد
مایکوپلاسما فرمنتانس(M.fermentance)	۳۹(۳۵/۵)
مایکوپلاسما آرجینینی(M.arginini)	۲۸(۲۵/۵)
مایکوپلاسما هیورایینس (M.hyorhinis)	۲۶(۲۳/۶)
مایکوپلاسما اورال (M.orale)	۱۱(۱۰)
مایکوپلاسما سالیواریوم(M.salivarium)	۲ (۱/۸)
مایکوپلاسماپیروم (M.pirum)	۲ (۱/۸)
آکولوپلاسما لیدلاوی (A.ladlawii)	۱ (۰/۹)
اوره‌آپلاسما اوره‌آلایتیکوم(U.urealyticum)	۱ (۰/۹)
مجموع	۱۱۰ (۱۰۰)

www.mui.ac.ir



شکل ۱. الگوی الکتروفروزی DNA استخراج شده‌ی مایکوپلاسما با روش پروتئیناز K

۱- چاهک ۱ DNA باکتری مایکوپلاسما اورال(ATCC 19524)
۲- چاهک ۲DNA باکتری مایکوپلاسما بویس(RITC 1596)
۳- چاهک ۳ DNA باکتری *E. coli*(ATCC 25922)
۴- چاهک ۴ DNA سلول CCRF- CEM (NCBI 2105)



شکل ۲. الگوی الکتروفروزی PCR اختصاصی جنس مایکوپلاسما

۱- چاهک ۱ مارکر DNA شماره‌ی ROCH VIII
۲- چاهک ۲مایکو پلاسما اورال(ATCC 19524)
۳- چاهک ۳ مایکوپلاسما بویس(RITC 1596)
۴- چاهک ۴ باکتری E. coli(ATCC 25922)
۵- چاهک ۵ DNAاستخراج شده از سلول‌های خون محیطی
۶- چاهک ۶ کنترل منفی آب مقطر دی‌یونیزه

بحث

مایکوپلاسما از جمله عوامل آلوده‌کننده‌ی معمول و اجتناب‌ناپذیر رده‌های سلولی است و این مسئله مشکل عمده‌ی تحقیقات بیولوژیکی در استفاده از کشت‌های سلولی است. بررسی‌های گو ناگونی بر روی آلودگی رده‌های سلولی با مایکوپلاسما انجام شده است و گزارشات مختلفی از آلودگی رده‌های سلولی بانک‌های سلولی سراسر جهان ارائه گردیده است.

میزان فراوانی آلودگی رده‌های سلولی به مایکو پلاسما ۳ تا ۶۳درصد(۹)، ۲۵تا ۲۹درصد(۳،۵)، ۵ تا ۸۷ درصد (۶)، ۲۰ تا ۳۵ درصد(۱۵)، ۱۵ تا ۳۵ درصد (۱۶) گزارش شده است.

بیش‌تر از ۱۲۰ گونه مولیکوت وجود دارد اما ۵ گونه از آن‌ها از عوامل اصلی آلوده‌کننده‌ی بیش از ۹۵ درصد رده‌های سلولی می‌باشند(۲،۳،۷،۹).

در مطالعه‌ی حاضر طی بررسی ۱۸۳ رده‌ی سلولی در رابطه با تعیین میزان آلودگی آن‌ها با مایکوپلاسما و انواع گونه‌های آلوده‌کننده‌ی مایکوپلاسمایی با روش کشت میکروبی و PCR نتایج زیر به دست آمده که مورد بررسی قرار می‌گیرند.این مطالعه نشان می‌دهد کشت میکروبی ۱۸۳ رده‌ی سلولی مورد آزمایش در بانک سلولی ایران بر روی محیط مخصوص مایکوپلاسما در ۵۰ رده‌ی سلولی (۲۷/۳ درصد) آلودگی به مایکوپلاسما را نشان دادند. بررسی‌ها توسط روش حساس و دقیق PCR نشان می‌دهد که تعداد ۸۹ رده‌ی سلولی (۴۸/۶درصد) آلودگی به مایکوپلاسما دارند. نتایج فوق نتایج به دست آمده توسط سایر محققین را تأیید می‌کند که روش PCR در مقایسه‌ی با روش‌های دیگر از جمله کشت میکروبی، رنگ آمیزی DNA و تکنیک هیبریداسیون سریع‌تر، حساس‌تر و دقیق‌تر می‌باشد. بررسی‌های مختلف توسط محققین نشان داد که ۹۵ درصد از عوامل اصلی آلوده‌کننده‌ی رده‌های سلولی متعلق به ۵ گونه‌ی مایکوپلاسما (مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما اورال، مایکوپلاسما فرمنتانس، مایکوپلاسما هیورااینس، آکولوپلاسما لیدلاوی) هستند(۱۱).

نتایج مطالعه‌ی حاضر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه نشان داد که گونه‌های اصلی آلوده‌کننده‌ی رده‌های سلولی مورد مطالعه به ترتیب بیش‌ترین میزان آلوده‌کنندگی شامل مایکوپلاسما فرمنتانس، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورااینس، مایکوپلاسما اورال، مایکوپلاسما

www.mui.ac.ir

سالیواریوم، مایکوپلاسما پیروم، آکولوپلاسما لیدلاوی و اوره‌آپلاسما اوره‌آلایتیکوم هستند. فقط یک مورد آلودگی با آکولوپلاسما لیدلاوی مشاهده شد که این نشان می‌دهد بر خلاف نتایج ارائه شده توسط سایر محققین، این گونه از گونه‌های اصلی آلوده‌کننده‌ی رده‌های سلولی بانک سلولی ایران نبوده است. یکی دیگر از موارد مورد بحث در این مطالعه تعیین آلودگی رده‌های سلولی با بیش از یک گونه‌ی مایکوپلاسما بود. از ۷۵ رده سلولی که با پرایمرهای اختصاصی واکنش مثبت دادند, ۱۶ رده‌ی سلولی آلودگی به ۳ گونه‌ی مایکوپلاسما، ۱۸ رده‌ی سلولی آلودگی به ۲ گونه و ۴۱ رده‌ی سلولی تنها آلوده به یک گونه مایکوپلاسما بودند.

از جمله موارد مورد بحث در این مطالعه این است که آزمایش PCR با پرایمرهای عمومی ۸۹ رده سلولی آلودگی به مایکوپلاسما را نشان دادند در حالی که با پرایمرهای اختصاصی گونه، ۷۵ رده‌ی سلولی را توانستیم شناسایی و نوع گونه‌ی آلوده‌کننده را مشخص نماییم. با روش کشت میکروبی تنها ۵۰ رده‌ی سلولی آلودگی به مایکوپلاسما را نشان دادند. یکی از دلایلی که ما نتوانستیم هر ۸۹ رده‌ی سلولی آلوده را با پرایمرهای اختصاصی شناسایی کنیم می‌تواند به دلیل عدم دسترسی به همه گونه‌های کنترل مثبت مایکوپلاسما باشد که امکان بهینه‌سازی آزمون PCR را برای همه‌ی گونه‌ها مشکل می‌سازد. از طرف دیگر به دلیل این که بیش از ۱۲۰ گونه‌ی مولیکوت آلوده‌کننده‌ی رده‌ی سلولی وجود دارد (۲) و تنها ۱۱ زوج پرایمر اختصاصی طراحی شده بود، ولی پرایمرهای عمومی قابلیت شناسایی سویه‌های غیرمعمول آلوده‌کننده‌ی رده‌ی سلولی را داشتند, لذا عدم واکنش برخی از نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی قابل توجیه است. از موارد دیگر حساسیت پایین کشت میکروبی در مقایسه‌ی با روش PCR است. این تفاوت می‌تواند به دلیل عدم وجود شرایط اپتیمم کشت برای همه‌ی گونه‌های آلوده‌کننده باشد. یکی از مهم‌ترین موارد قابل بحث در این مطالعه حساسیت و سرعت روش PCR در مقایسه‌ی با روش کشت میکروبی می‌باشد. در کشت میکروبی بر روی محیط‌های مخصوص مایکوپلاسما برای تشخیص آلودگی به حداقل ۱۰ روز زمان نیاز است ولی با روش PCR جواب آزمایش ۳ تا ۴ ساعت بعد داده می‌شود.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که روش معمول برای تشخیص آلودگی رده‌های سلولی به مایکوپلاسما روش کشت میکروبی و روش رنگ‌آمیزی است و این روش‌ها زمان‌بر بوده و هم‌چنین از حساسیت پایینی نیز برخوردار هستند و سرعت عمل در تشخیص آلودگی رده‌های سلولی به منظور درمان رده‌ی سلولی آلوده و جلوگیری از آلوده شدن رده‌های سلولی سالم حائز اهمیت است. لذا توصیه می‌شود روش PCR که دارای حساسیت و سرعت عمل بسیار بالاتری است جایگزین روش‌های فوق گردد.

References

1. Hay RJ, Macy ML, Chen TR. Mycoplasma infection of cultured cells. Nature 1989; 339(6224): 487-488.
2. Tully JG. Mollicutes In: Encylopedia of Microbiology Vol3. San Diego: Academic press, 1992.

www.mui.ac.ir

3. Bolske G. Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A 1988; 269(3): 331-40.
4. Pawar V, Luczak J, Cox MS, Dubose J, Harbell JW. Trends in the incidence and distribution of mycoplasma contamination detected in cell lines and their products. Int Organ Mycoplasma Lett, 1994.
5. Polak-Vogelzang AA, Brugman J, Reijgers R. Comparison of two methods for detection of mollicutes (Mycoplasmatales and Acholeplasmatales) in cell cultures in the Netherlands. Antonie Van Leeuwenhoek 1987; 53(2): 107-18.
6. Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, MacLeod RA, Quentmeier H, et al. Sensitivity and specificity of five different mycoplasma detection assays. Leukemia 1992; 6(4): 335-41.
7. Arai S, Harasawa R, Ohno T, Takeuchi M, Lee I, Kato K, et al. Comparative studies to detect mycoplasma Contamination in biondustrial for validating standard method. Int Organ Mycoplasma Lett 1994; 3: 48-9.
8. Mc Garrity GJ, Kotani H, Butler GH. Mycoplasmas and Tissue Culture Cells. Mycoplasmas biology and pathogenesis. Washgington DC: American Society for Microbiology, 1992: 445-54.
9. McGarrity GJ, Kotani H, Carson D. Comparative studies to determine the efficiency of 6 methylpurine deoxyriboside to detect cell culture mycoplasmas. In Vitro Cell Dev Biol 1986; 22(6): 301-4.
10. Somerson NL, Cole BC. The mycoplasma flora of human and nonhuman primates. New York: The Mycoplasmas. Academic press, 1979.
11. Barile MF, Rottem S. Mycoplasma in cell structures. In: Kahane I, Adoni A, editors. Rapid diagnosis of mycoplasmas. New York: Plenum Press, 1993: 155-93.
12. Dussurget O, Roulland-Dussoix D. Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. Appl Environ Microbiol 1994; 60(3): 953-9.
13. Rawadi G, Lecaque D, Pirot D, Roman-Roman S. Detection and identification of mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. Methods Mol Cell Biol 1993; 4: 147-56.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3 Volume Set). 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
15. (Manfred W, Memrtina G, Hansjorg H. Mycoplsma detection by the mycoplasma PCR-ELISA . Biotech, 1995.
16. Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2002; 38(2): 79-85.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School **Original Article**

Vol 28. No 121. 1st week. March 2011 Received: 18.7.2010 Accepted: 2.10.2010

The Comparison of Microbial Culture and PCR Methods in Detection Of Cell Line to Mycoplasma

Mohammad Reza Arabestani[1] ,Hossain Fazeli PhD[2], Mahmmud Jedi Tehrani PhD[3], Fazel Shokri PhD[4]

Abstract

Background: Mycoplasma is a major contaminant agent of cell lines and is cosiderd as a serious problem of economic and biological importance in basic research, diagnosis, and biotechnology products. Detection of mycoplasma infection in cell cultures started on microbiological culture; later, other methods like DAPI staining and serological tests such as Indirect Immunofluorescnse, ELISA, DNA probe, PCR, PCR-ELISA, and Real-Time PCR developed for detection of mycoplasma. In this study, we detect the contamination of varity of mycoplasma species in cell lines in national cell bank of Iran.

Methods: In this study, a sensitive, specific, and rapid method was used for detection of varity of mycoplasma species in cell lines. This method was based on a PCR reaction using genus specific primers for 11 mycoplasma species.

Results: Mycoplasma contamination using this assay was examind for 183 different cell lines deposited in national cell bank of Iran. PCR showed that 48.6% of cell lines were contaminated with mycoplasma while 27.3% of them were found to be infected by microbial culture. In comparison to microbiological culture, PCR method was shown to be 100% sensitive and 70.7% specific.

Conclusion: Our results using species specific primers reveald that the most important contaminating mycoplasma species in cell lines were mycoplasma fermentans, mycoplasma arginini, mycoplasma hyorhinis, and mycoplasma orale. We were also able to identify a number of cell lines which were contaminated whit more than one species of mycoplasma.

Key word: Mycoplasma, Cell lines, Microbiological culture, PCR

[1] PhD Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
[3] Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
[4] Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Mohammad Reza Arabestani, Email: mr_arabestani@yahoo.com

www.mui.ac.ir