مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی آلودگی *مایکوپلاسما اوراله* در کشت‌های سلولی با استفاده از روش PCR

عنوان کوتاه: شناسایی آلودگی مایکوپلاسما اوراله

آزاده فضلی[۱]، سید علی پور بخش*[۳]، اسماعیل اصلی[۲]، اعظم حدادی[۳]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران

۲. آزمایشگاه رفرنس مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۱/۱۲

پذیرش:۱۳۹۲/۰۳/۲۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۲/۰۸/۱۵

IJMM 1392; 7(2): P 7-14

نویسنده مسئول:

سید علی پور بخش

آزمایشگاه رفرنس مایکوپلاسما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۱۳۲۵۴۱۱

پست الکترونیک:

a.pourbakhsh@rvsri.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: آلودگی کشت‌های سلولی توسط مایکوپلاسماها مسئله‌ای مهم در فناوری کشت سلولی محسوب می‌شود. میزان بالایی از کشت‌های سلولی آلوده به *مایکوپلاسما اوراله* هستند که عموماً توسط کارکنان آزمایشگاه صورت می‌گیرد. بنابراین شناسایی و تشخیص آن به‌منظور جلوگیری از زیان‌های مهم به دنبال آلودگی با این ریزاندامگان‌ها (Microorganism) بسیار حائز اهمیت است. هدف این مطالعه راه‌اندازی و به‌کارگیری روش واکنش زنجیره پلی‌مراز به‌عنوان روشی سریع، حساس و اختصاصی برای تشخیص *مایکوپلاسما اوراله* در آلودگی‌های کشت سلولی و فراورده‌های زیست‌شناختی است.

مواد و روش کار: با به‌کارگیری سویه استاندارد *مایکوپلاسما اوراله*، تست PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی گونه *مایکوپلاسما اوراله* در ناحیه ژن 16S rRNA راه‌اندازی گردید. ٦٢ نمونه کشت سلولی مشکوک به آلودگی مایکوپلاسما ارجاعی به آزمایشگاه رفرنس مایکوپلاسما موسسه رازی پس از استخراج DNA مورد آزمایش PCR قرار گرفتند.

یافته‌ها: تست PCRراه‌اندازی‌شده با DNA *مایکوپلاسما اوراله* دارای واکنش مثبت بود، در صورتی که با سایر گونه‌های مایکوپلاسما نظیر: *مایکوپلاسما سالیواریوم*، *مایکوپلاسما هیورینیس*، *مایکوپلاسما آرژنینی*، *آکولوپلاسما لایدلاوی*، *مایکوپلاسما فرمنتانس*، *مایکوپلاسما پنومونیه* و همچنین با *اشریشیا کلی* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* واکنش نداد که نشان‌دهنده ویژگی بالای این تست بود. از تعداد ٦٢ نمونه کشت سلولی ٤٢ نمونه از نظر جنس مایکوپلاسما و ٨ نمونه از نظر گونه *مایکوپلاسما اوراله* مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به میزان بالای آلودگی کشت‌های سلولی به *مایکوپلاسما اوراله* و ویژگی بالای تست PCR راه‌اندازی‌شده در این مطالعه، به‌کارگیری این روش در تشخیص آلودگی کشت‌های سلولی در آزمایشگاه‌های کشت سلولی توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: *مایکوپلاسما اوراله*، *PCR*، *شناسایی*، *کشت سلول*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

در چند سال اخیر مطالعه مایکوپلاسماها و تأثیرات آلودگی مایکوپلاسماها در فناوری کشت سلولی و بافت اهمیت شایان توجهی یافته است. از کشف اولین مایکوپلاسمای آلوده‌کنندهٔ کشت‌های سلولی حدود ۶ دهه می‌گذرد و تا به امروز نیز آلودگی مایکوپلاسمایی به‌عنوان یکی از مشکلات مهم آزمایشگاه‌های کشت سلولی در نظر گرفته می‌شود، به‌طوری که در ۸۰-۱۵ % کشت‌های سلولی موجود در آزمایشگاه‌های کشت سلولی، آلودگی گستردهٔ گونه‌های مختلف مایکوپلاسما مشاهده شده است (۱). این باکتری‌ها می‌توانند تغییراتی را در ساختار و عملکرد سلول‌های میزبان ایجاد کنند، مانند تغییر در متابولیسم اسیدهای نوکلئیک (۲،۳)، ایجاد اختلالات کروموزومی (۴)، القاء تغییرات

غشایی و ترانسفورماسیون سلولی، ایجاد تغییرات در ریخت‌شناسی (Morphology) سلول‌ها (۵)، القاء یا ممانعت از فعالیت لنفوسیت‌ها (۶،۷)، تداخل با انواع آزمایش‌های زیست‌شناختی و زیست‌شیمیایی، تأثیر بر سیگنال‌های انتقالی، تغییر در صفات تکثیر سلول‌ها که در نتیجهٔ مصرف مواد غذایی محیط کشت و همچنین ترشح محصولات کاتابولیکی مضر و خطرناک است (۱۰-۸)، تغییر در بیان ژن‌های گوناگون و ممانعت از سنتز پروتئین (۲،۳). همچنین آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی از نظر اقتصادی زیان‌هایی را به دنبال دارد که از جمله می‌توان به این موارد اشاره کرد: از دست دادن زمان، هزینه و تلاش‌های انجام‌شده، از دست دادن سلول‌های ارزشمند، نتایج گمراه‌کننده، تأثیر بر روی اعتبار و اهمیت اطلاعات حاصل از تحقیق انجام‌شده، اثرات منفی بر روی کیفیت و کمیت سلول‌های مورد استفاده در ساخت واکسن، اینترفرون، آنتی‌بادی‌های منوکلونال، پروتئین‌های نوترکیب و سایر داروهای مرتبط (۱۱،۱۲). بنابراین، ایجاد یک روش تشخیص روتین برای آلودگی‌های مایکوپلاسمایی به‌منظور کسب نتایج تحقیقاتی قابل‌اعتماد، امری ضروری و انکارناپذیر است. تاکنون بیش از ۲۰ گونه مایکوپلاسما متفاوت از کشت‌های سلولی، جداسازی شده است که می‌توانند منشأ انسانی یا حیوانی داشته باشند (۱۳،۱۴). در این میان *مایکوپلاسما هیورینیس*، *مایکوپلاسما آرژنینی*، *مایکوپلاسما اوراله*، *مایکوپلاسما سالیواریوم*، *مایکوپلاسما فرمنتانس* و *آکولوپلاسما لایدلاوی* در آلوده کردن کشت‌های سلولی نقش اصلی دارند (۱،۴،۱۵). مایکوپلاسماها از خانوادهٔ مولیکوتس و جزو کوچک‌ترین پیش‌هسته‌ای‌ها (Prokaryote) هستند که فاقد دیواره سلولی‌اند. آنها باکتری‌هایی با تنوع شکلی زیاد، بی‌هوازی اختیاری، دارای زندگی آزاد و عموماً کندرشد هستند و توانایی عبور از فیلتر غشایی با منافذی در حدود ۰/۲۲-۴۵ µm را دارند (۱۶). دستگاه تنفسی فوقانی انسان گاهی می‌تواند میزبان تعدادی از گونه‌های مایکوپلاسمای انسانی به‌صورت همسفرگی باشد. از جمله این ریزاندامگان‌ها (Microorganism) می‌توان *مایکوپلاسما اوراله*، *مایکوپلاسما سالیواریوم*، *مایکوپلاسما لیپوفیلوم*، *مایکوپلاسما فاسیوم*، *مایکوپلاسما بوساله* را نام برد (۱۷،۱۸). این ریزاندامگان‌ها بدون ایجاد بیماری در میزبان سالم خود زندگی می‌کنند، اما با تغییر شرایط طبیعی می‌توانند به‌صورت عامل ثانویه به میزبان خود صدمه بزنند (۱۹). این ریزاندامگان‌ها به دلیل ساکن بودن در دهان به‌راحتی در نتیجه پخش ریزقطره‌های ایجادشده قابل انتقال هستند. بر اساس چنین ویژگی‌هایی این ریزاندامگان‌ها می‌توانند یکی از عوامل مهم آلوده‌کننده کشت سلولی محسوب گردند. در حدود ۶۰-۳۰٪ از نمونه‌های سواپی گلو افراد سالم حاوی *مایکوپلاسما اوراله* است. این باکتری در ۴۰-۲۰٪ کشت‌های سلولی آلوده به مایکوپلاسماها، قابل جداسازی است (۱،۱۱) و از طریق ذرات تولیدی در سرفه ، عطسه یا صحبت کردن کارکنان آزمایشگاه‌های کشت سلولی انتشار می‌یابد. با توجه به این مطلب که حتی در بهترین آزمایشگاه‌ها هم احتمال ایجاد آلودگی وجود دارد و با علم به اینکه آلوده شدن کشت‌های سلولی با مایکوپلاسما ها از جمله *مایکوپلاسما اوراله* پیامدهای جبران‌ناپذیری را از نظر زمان، هزینه، از دست دادن سلول‌ها و محصولات ارزشمند و همچنین تحقیقات مهم به دنبال خواهد داشت، تشخیص این باکتری‌ها به صورت روتین در تمام آزمایشگاه‌های کشت سلولی حائز اهمیت می‌باشد. در ایران مطالعات معدودی در زمینه شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی و فراورده‌های بیولوژیکی به روش PCR صورت گرفته که در حد شناسایی جنس مایکوپلاسما بوده است. به طوری که در سال ۱۳۸۷ مطالعه‌ای توسط شاه حسینی و همکارانش در این زمینه صورت گرفت (۲۰)؛ اما شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی در حد گونه به خصوص شناسایی *مایکوپلاسما اوراله* برای اولین بار در ایران توسط مطالعه حاضر انجام شد. مطالعات متعددی در کشورهای گوناگون در خصوص شناسایی آلودگی *مایکوپلاسما اوراله* انجام گرفته است (۲۴، ۲۲، ۲۳، ۲۱، ۱۳،۱۶، ۱). میزان بالایی از کشت‌های سلولی آلوده به *مایکوپلاسما اوراله* هستند که توسط کارکنان آزمایشگاه صورت می‌گیرد. بنابراین شناسایی و تشخیص آن به‌منظور جلوگیری از زیان‌های مهم ناشی از آلودگی با این ریزاندامگان‌ها بسیار حائز اهمیت است. هدف این مطالعه به‌کارگیری روشی سریع، حساس و اختصاصی بر اساس واکنش زنجیره پلی‌مراز و تکثیر قطعه‌ای از ژن 16S rRNA برای تشخیص آلودگی *مایکوپلاسما اوراله* در کشت‌های سلولی بوده است.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه از سویه‌ی *مایکوپلاسما اوراله* NC10112-06 به‌عنوان کنترل مثبت و *مایکوپلاسما سالیواریوم*، *مایکوپلاسما هیورینیس*، *مایکوپلاسما آرژنینی*، *آکولوپلاسما لایدلاوی*، *مایکوپلاسما فرمنتانس*، *مایکوپلاسما پنومونیه* از بانک میکربی

آزمایشگاه رفرنس موسسه رازی و *اشریشیا کلی* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* از کلکسیون باکتری بخش میکرب‌شناسی موسسه رازی برای استفاده در آزمایش ویژگی و ۶۲ نمونه کشت سلولی ارجاعی از مراکز آموزشی و پژوهشی کشور به آزمایشگاه رفرنس مایکوپلاسما موسسه رازی استفاده شد. استخراج DNA مایکوپلاسماهای موجود در نمونه‌های کشت سلولی به‌عنوان DNA الگو برای واکنش PCR به روش فنل-کلروفرم صورت گرفت (۲۴).

پرایمرها

در این مطالعه، پرایمرهای پیشرو و معکوس به‌منظور شناسایی جنس مایکوپلاسما طراحی‌شده توسط وان کاپویلد در سال ۱۹۹۲ مورد استفاده قرار گرفت (۲۵).

همچنین از پرایمرهای پیشرو و معکوس به‌منظور شناسایی گونه مایکوپلاسما اوراله از ژن16S rRNA طراحی‌شده توسط تایمتسکی در سال ۲۰۰۶ مورد استفاده قرار گرفت (۲۳).

راه‌اندازی PCR

راه‌اندازی PCR اختصاصی گونه *مایکوپلاسما اوراله* NC10112-06 به‌منظور حذف باندهای غیراختصاصی و ایجاد تک‌باند اختصاصی در ناحیه 583 bp با ایجاد تغییراتی در مخلوط اصلی و انجام چندین مرحله آزمایش گرادیانت انجام گرفت. پس از مشاهده تک‌باند اختصاصی در ناحیه مورد نظر و به‌منظور تأیید قطعی یک نمونه محصول PCR *مایکوپلاسما اوراله* استاندارد جهت تعیین توالی فرستاده شد و با موارد ثبت‌شده مایکوپلاسما اوراله در بانک ژن مقایسه و تأیید گردید.

انجام PCR

برای شناسایی جنس مایکوپلاسما مخلوط اصلی شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۵۰۰ میلی‌مولار از $MgCl_2$(۵۰ میلی‌مولار)، ۵ میلی‌مولار از dNTPs (۱۰ میلی‌مولار) مخلوط، ۲۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس، ۱ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز (5u/1µL)، ۲ میکرولیتر DNA الگو و آب مقطر سترون تا حجم نهایی هر نمونه به ۲۵ میکرولیتر برسد. برنامه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر شامل ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه برای یک دور، ۹۴ °C به مدت ۴۰ ثانیه،۵۸ °C به‌مدت ۶۰ ثانیه، ۷۰°C به‌مدت ۵۰ ثانیه طی ۴۰ دور PCR و پلیمرازسیون نهایی در ۷۲°C به‌مدت ۷ دقیقه بود.

برای شناسایی گونه مایکوپلاسما اوراله مخلوط اصلی شامل۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (10x)،۵۰ میلی‌مولار از $MgCl_2$(۵۰ میلی‌مولار)، ۳ میلی‌مولار از dNTPs (۱۰ میلی‌مولار) مخلوط، ۱۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و معکوس، ۱ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز(5u/1µl) ، ۲ میکرولیتر DNA الگو و آب مقطر سترون تا حجم نهایی هر نمونه به ۲۵ میکرولیتر برسد. برنامه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر شامل: ۹۵ °C به‌مدت ۷ دقیقه برای یک دور، ۹۵ °C به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰°C به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲°C به‌مدت ۶۰ ثانیه طی ۳۵ دور PCR و پلیمرازسیون نهایی در ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. در این مطالعه، محصولات PCR در کنار سایز مارکر، کنترل مثبت و منفی با استفاده از الکتروفورز به روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و در زیر نور فرابنفش مورد بررسی قرار گرفتند.

حساسیت و ویژگی آزمون PCR

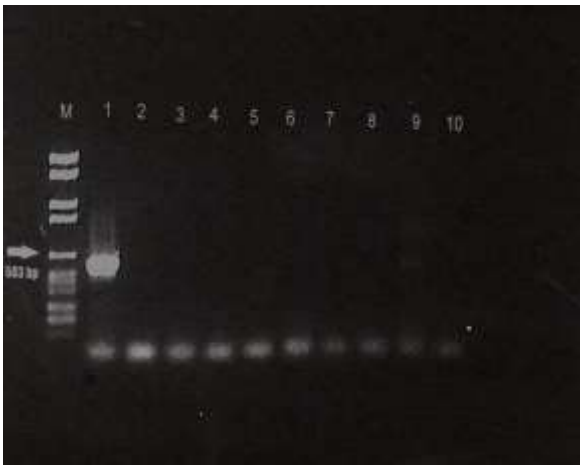
برای انجام واکنش PCR به‌منظور بررسی حساسیت جفت پرایمرها مورد استفاده، از DNA *مایکوپلاسما اوراله* استاندارد NC10112-06 استفاده شد. از آن رقت‌سازی سریالی ۱۰ تایی در ده تیوپ مجزا از رقت ۸ng/µl تا ۰/۰۰۸ng/µl انجام گرفت، سپس واکنش PCR طبق برنامه و واکنش ذکرشده انجام گرفت. همچنین در شروع کار برای یکنواخت کردن شرایط آزمایشگاه و به‌دلیل کاهش میزان آلودگی، ابتدا مخلوط اصلی تهیه می‌شود. مخلوط اصلی جهت واکنش PCR جنس مایکوپلاسما حاوی بررسی ویژگی جفت پرایمرها PCR، از *مایکوپلاسما اوراله* استاندارد به‌عنوان کنترل مثبت و *مایکوپلاسما سالیواریوم*، *مایکوپلاسما هیورینیس*، *مایکوپلاسما آرژنینی*، *آکولوپلاسما لایدلاوی*، *مایکوپلاسما فرمنتانس*، *مایکوپلاسما پنومونیه*، *اشریشیاکلی* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* استفاده شد و سپس واکنش PCR گونه *مایکوپلاسما اوراله* انجام گرفت.

جدول ۱: ژن هدف و پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر(5′-3′)	اندازه باند
GPO3	5´-GGGAGCAAACACGATAGATACCCT -3´	270 bp
MGSO	5´-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC -3´	
UNI	5'- TAATCCTGTTTGCTCCCCAC- 3'	583 bp
ORA	5'- GGAGCGTTTCGTCCGCTAAG- 3'	

یافته‌ها:

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه مایکوپلاسما اوراله آزمایش PCR با تغییرات اعمال‌شده راه‌اندازی و تک‌باند اختصاصی در ناحیه ۵۸۳bp مشاهده شد. به‌منظور تأیید قطعی، یک نمونه محصول PCR *مایکوپلاسما اوراله* استاندارد برای تعیین توالی فرستاده شد و با موارد ثبت‌شده *مایکوپلاسما اوراله* در بانک ژن مقایسه و تأیید گردید. برای تعیین ویژگی PCR راه‌اندازی‌شده از DNA *مایکوپلاسما سالیواریوم*، *مایکوپلاسما هیورینیس*، *مایکوپلاسما آرژنینی*، *آکولوپلاسما لایدلاوی*، *مایکوپلاسما فرمنتانس*، *مایکوپلاسما پنومونیه*، *اشریشیا کلی* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* استفاده شد که جفت پرایمرهای اختصاصی با هیچ یک از DNA این باکتری‌ها واکنش مثبت نداد که نشان‌دهنده ویژگی بالای این آزمایش بود (تصویر ۱).

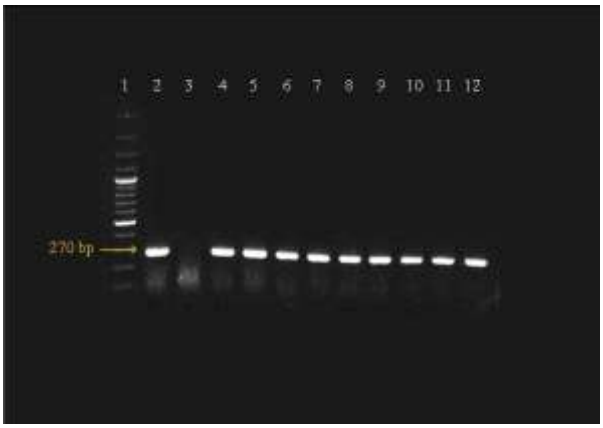


شکل ۱: بررسی محصول PCR در آزمایش ویژگی: ردیف M: مارکر (Gene Ruler 100pb) ردیف ۱: کنترل مثبت (نمونه استاندارد *مایکوپلاسما اوراله*)، ردیف ۲: کنترل منفی، ردیف ۸-۳ نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه.

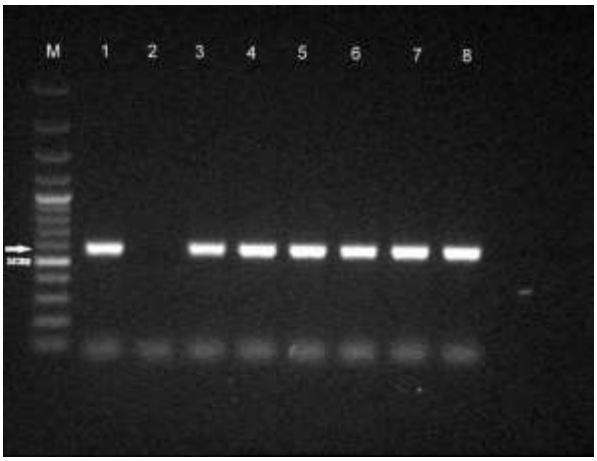
ست PCR جهت تعیین حساسیت انجام گرفت و حساسیت این آزمون برابر ۸pg/µl نشان داده شد (تصویر ۲).

شکل ۲: بررسی محصول PCR در آزمایش تعیین حساسیت: ردیف M: مارکر (Gene Ruler 100pb)، ردیف ۱: کنترل منفی، ردیف‌های ۱۱-۲ رقت‌های متفاوت (X۱۰) از DNA *مایکوپلاسما اوراله* به ترتیب l8ng/µl، l80ng/µl، l80pg/µl، l8pg/µl در ردیف‌های ۵-۲

از ۶۲ نمونه کشت سلولی مورد مطالعه از نظر آلودگی به مایکوپلاسما، (۴۲)۶۷/۷۵٪ (نمونه) از نظر جنس مایکوپلاسما مثبت شدند (تصویر ۳) که از این میان ۸(۱۹٪) نمونه از نظر *مایکوپلاسما اوراله* مثبت بودند (تصویر ۴).



شکل ۳: *بررسی محصول* ***PCR*** *جنس مایکوپلاسما در نمونه‌های مورد آزمایش: ردیف ۱: مارکر (****Gene Ruler 100pb****) ردیف ۲: کنترل مثبت، ردیف ۳: کنترل منفی، ردیف‌های ۸-۳ نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه.*



شکل ۴: بررسی محصول **PCR** گونه مایکوپلاسما اوراله در نمونه‌های مورد آزمایش: ردیف **M**: مارکر (**Gene Ruler 100pb**) ردیف ۱: کنترل مثبت اوراله، ردیف ۲: کنترل منفی، ردیف‌های ۸-۳ نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه.

بحث:

در این مطالعه به‌منظور بررسی آلودگی *مایکوپلاسما اوراله* در کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه رفرنس مایکوپلاسمای موسسه رازی، روش PCR با حساسیت و ویژگی مناسب راه‌اندازی گردید و نشان داده شد که کشت‌های سلولی ارجاعی با درصد بالایی آلوده به *مایکوپلاسما اوراله* بودند. مایکوپلاسماها کوچک‌ترین پیش‌هسته‌ای‌هایی (Prokaryote) هستند که توانایی همانندسازی دارند. مایکوپلاسماها به‌دلیل اندازه کوچک و فقدان دیوارهٔ سلولی از باکتری‌های دیگر متمایز می‌شوند(۲). آلودگی کشت‌های سلولی توسط مایکوپلاسماها یک مشکل بزرگ در آزمایشگاه‌های کشت سلولی محسوب می‌شود، چرا که می‌توانند به غلظت بالایی در کشت‌ها برسند بدون اینکه آثار قابل‌مشاهده‌ای از جمله کدورت، تغییر pH یا تغییر رنگ ایجاد کنند (۲۷،۲۶،۱). انتقال آلودگی به کشت‌های سلولی توسط کارکنان آزمایشگاه، سرم یا مواد موجود در کشت و یا از رده‌های سلولی آلودهٔ ارسالی به آزمایشگاه صورت می‌گیرد (۲۸). *مایکوپلاسما اوراله*، به‌عنوان یک گونه متداول آلوده‌کنندهٔ کشت‌های سلولی به‌شمار می‌رود، به‌صورت همسفره ساکن اوروفارنکس انسان‌های سالم است و ممکن است از طریق ذرات تولیدشده در صحبت کردن یا عطسه کردن کارکنان آزمایشگاه در محیط پراکنده شوند و سبب آلوده شدن کشت‌های سلولی گردند. زیان‌های جبران‌ناپذیر در نتیجه آلودگی کشت‌های سلولی توسط مایکوپلاسماها از جمله *مایکوپلاسما اوراله* به وجود می‌آید که بسیار حائز اهمیت هستند. اولین بار در سال ۱۹۵۶ وقوع آلودگی مایکوپلاسمایی در یک ردهٔ سلولی توسط رابینسون و همکارانش مشاهده شد (۱). تا سال ۱۹۶۰ مقالات زیادی در مورد اثرات آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی منتشر شد و میزان وقوع و شیوع آلودگی مایکوپلاسمایی را در بیش از ۶۰٪ از کشت‌های سلولی گزارش گردید (۱،۸). مطالعات اولیه برای شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی ابتدا به‌وسیله کشت میکربی آغاز شد که روش استاندارد برای تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی محسوب می‌شود (۲۹). سپس با بررسی میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی مستقیم DNA با رنگ فلورسنس DAPI, Hoechst 33258 (۴،۳۰)، بررسی خواص متابولیکی و زیست‌شیمیایی گسترش یافت (۱،۳۱). بیشتر این روش‌ها برای تشخیص سریع، ویژه و دقیق گونه‌های شایع آلوده‌کننده در کشت‌های سلولی مناسب نیستند و از طرفی بسیار وقت‌گیر و پرهزینه و نیازمند مفسرهای باتجربه هستند. از این میان روش‌هایی که بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز هستند برای شناسایی بخش‌هایی از DNA ژنومی مایکوپلاسما در تمامی گونه‌های جنس آن، خصوصاً سکانس‌های ثابت و مشترک 16S rRNA، به‌عنوان روشی سریع و ویژه گسترش یافته‌اند (۳۲). روش PCR دارای حساسیت و ویژگی بالاتری است و می‌تواند آلودگی مایکوپلاسمایی را به‌میزان بیشتری نسبت به کشت ردیابی کند و از طرف دیگر نسبت به کشت، بسیار سریع‌تر و

ارزان‌تر است (۳۳،۳۴)، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آزمایش PCR می‌تواند به‌عنوان روش جایگزین برای کشت، با توانایی بسیار بالا در ارائه آمار واقعی آلودگی کشت‌های سلولی به مایکوپلاسما توصیه گردد. شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی بر اساس روش PCR اولین‌بار در سال ۱۹۸۹ آغاز شد (۱) و در سال‌های بعد توسعه یافت. به‌طور مثال یوفوف و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۷)، Sung H و همکارانش در سال ۲۰۰۶(۹)، Dvorakova و همکارانش در سال ۲۰۰۵ (۳۵)، Timenetsky و همکارانش در سال ۲۰۰۶ (۲۳) و Young و همکارانش در سال ۲۰۱۰ (۳۶)، تحقیقاتی را به روش PCR جهت جداسازی مایکوپلاسماهای آلوده‌کنندهٔ کشت‌های سلولی انجام دادند. در ایران در سال ۱۳۸۷ تحقیقی برای تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت‌های سلولی به روش PCR توسط Shahosseini و همکارانش صورت گرفته است. در مطالعه آنها آلودگی مایکوپلاسمایی در ۴۷ نمونه کشت سلولی به‌وسیله PCR مخصوص جنس جستجو شد که از این تعداد ۲۵(۵۳٪) رده سلولی به مایکوپلاسما آلوده بودند (۲۰). *مایکوپلاسما اوراله* به‌عنوان یکی از مایکوپلاسماهای انسانی اصلی آلوده‌کننده کشت‌های سلولی به‌شمار می‌رود، به‌طوری که میزان شیوع آن در کشت‌های سلولی به‌طور کلی ۴۰-۲۰٪ گزارش شده است (۳۱ و ۱). اگر چه در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در کشورهای مختلف جهت شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی از جمله *مایکوپلاسما اوراله* انجام شده است، ولی تاکنون در زمینه شناسایی و تشخیص ملکولی *مایکوپلاسما اوراله* در کشت‌های سلولی در ایران مطالعه منتشرشده‌ای وجود ندارد. بر این اساس و با توجه به شیوع بالای این مایکوپلاسما نسبت به سایر مایکوپلاسماهای انسانی آلوده‌کننده کشت سلولی، مطالعه‌ای به‌منظور شناسایی *مایکوپلاسما اوراله* در کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه رفرنس مایکوپلاسمای موسسه رازی انجام شد. در این مطالعه به‌منظور شناسایی *مایکوپلاسما اوراله* از پرایمرهای طراحی‌شده توسط Timenetsky استفاده شد (۲۳) که با ایجاد تغییراتی آزمایش PCR راه‌اندازی گردید. سپس حساسیت و ویژگی این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. حساسیت این آزمایش برابر pg/µL ۸ بود و از ویژگی بالایی برخوردار بود. Timenetsky و همکارانش در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای جهت بررسی آلودگی‌های چندتایی مایکوپاسمایی در کشت‌های سلولی به روش PCR انجام دادند. میزان حساسیت آزمایش PCR در آن مطالعه برابر pg/µL ۱ بود. ۳۰۱ کشت سلولی از ۱۵ آزمایشگاه تهیه شد و به‌وسیله دو روش کشت میکربی و PCR مقایسه گردید. در ۱۲ آزمایشگاه، آلودگی مایکوپلاسمایی به میزان ۹۳(۳۱٪) توسط PCR با پرایمر اختصاصی جنس مایکوپلاسما و ۶۹ (۲۳٪) توسط کشت تأیید شد. برای این تعداد جنس مثبت با پرایمر اختصاصی گونه *مایکوپلاسما اوراله* واکنش PCR انجام شد و میزان آلودگی *مایکوپلاسما اوراله* در ۱۱٪ از نمونه‌ها گزارش شد. مطالعاتی توسط Barile و همکارانش در سال ۱۹۷۳ (۱۳)، Gardella و همکارانش در سال ۱۹۸۴(۲۱)، Bolske در سال ۱۹۸۸(۱۶)، Uphoff در سال ۲۰۰۱ انجام شد (۲۲)، میزان شیوع *مایکوپلاسما اوراله* را در کشت‌های سلولی به ترتیب ۳۹٪، ۳۵٪، ۴۲٪، ۳۴٪، ۴۰-۲۰٪ گزارش کردند. Uphoff و همکارانش در سال ۲۰۰۲ (۱) در یک تحقیق دیگر، ۴۹۵ کشت سلولی را از نظر آلودگی به مایکوپلاسما ها به روش PCR مورد بررسی قراردادند. در نتیجه این مطالعه، مشخص شد که *مایکوپلاسما اوراله* به میزان ۱۰٪ از میان سایر مایکوپلاسماهای آلوده‌کننده، در این کشت‌های سلولی حضور دارد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در کشورهای گوناگون و میانگین آماری به‌دست آمده از این مطالعات که میزان شیوع *مایکوپلاسما اوراله* را در کشت‌های سلولی در حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد نشان می‌دهد. نتایج مطالعه حاضر، آلودگی *مایکوپلاسما اوراله* را به میزان ۱۹ نشان داد که با نتایج مطالعات مذکور مطابقت دارد. به‌طور کلی می‌توان گفت که این میزان آلودگی نشانگر شیوع بالای این مایکوپلاسما در آزمایشگاه‌های کشت سلولی است که در نتیجهٔ رعایت نکردن اصول اولیه برای ممانعت از بروز آلودگی‌های احتمالی است (۳۷). بنا بر آمار ارائه‌شده توسط محققان مختلف در کشورهای مختلف و نتایج کسب‌شده در این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که با وجود به‌کار بستن بسیاری از روش‌های کاربردی در جلوگیری از آلودگی کشت‌های سلولی، در بسیاری از آزمایشگاه‌ها آلودگی کشت‌های سلولی با مایکوپلاسما ها به ویژه *مایکوپلاسما اوراله* رخ می‌دهد.

به‌طور کلی در این مطالعه آزمایش PCR برای شناسایی *مایکوپلاسما اوراله* برای اولین بار راه‌اندازی گردید که می‌تواند جهت بررسی آلودگی *مایکوپلاسما اوراله* در آزمایشگاه‌های کشت سلولی مورد استفاده قرار گیرد. ضمن راه‌اندازی PCR با حساسیت و ویژگی مناسب نشان داده شد که میزان قابل‌توجه‌ای

از کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه رفرنس مایکوپلاسما در موسسه رازی آلوده به *مایکوپلاسما اوراله* بودند و با توجه به این که تعداد معدودی از نمونه‌ها و در فاصله زمانی خاص از لحاظ آلودگی به *مایکوپلاسما اوراله* مورد بررسی قرارگرفته بودند، می‌توان در مطالعهٔ گسترده‌تر با تعداد نمونه‌های بیشتر درصد واقعی‌تری از آلودگی کشت‌های سلولی به مایکوپلاسما اوراله را به‌دست آورد و حساسیت و ویژگی آزمایش راه‌اندازی‌شده با اطمینان بیشتری مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین با توجه به این که تعداد زیادی از نمونه‌ها از نظر جنس مایکوپلاسما مثبت و تنها تعداد معدودی از آن‌ها آلوده به *مایکوپلاسما اوراله* بودند، می‌توان با بهره‌گیری از پرایمرهای مناسب و اختصاصی نسبت به شناسایی سایر گونه‌های مایکوپلاسمای آلوده‌کننده اقدام کرد.

تشکر و قدردانی

هزینه‌های این مطالعه از محل اعتبارات طرح شماره ۸۷۰۸۰-۱۸-۱۸-۲ مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین و پرداخت شده است. بدین وسیله از معاونت آموزش و تحقیقات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری‌های صمیمانه آقای دکتر عباس اشتری، دکتر علیرضا آبتین، مهدی حمزه و سرکار خانم سلیمه آهنگران‌و تمامی کارکنان آزمایشگاه رفرنس مایکوپلاسما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج سپاسگزاری می‌گردد.

References:

1. Hans GD, Cord CU. *Mycoplasma* contamination of cell cultures, incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002; 39:75-90.
2. Bader FG. Sterilization: prevention of contamination. In: manual of industrial microbiology and biotechnology. Demain AL, Solomon N A (ed). *American Society of Microbiology*, Washington, D.C; 1986; PP: 345-362.
3. Gong H, Zöl F, von Recklinghausen G, Rössler J, Breit S, Havers W, Fotsis T, Schweigerer L. Arginine deiminase inhibits cell proliferation by arresting cell cycle and inducing apoptosis. *Biochem Biophys Res Comm* 1999; 261:10-14.
4. McGarrity MF, Vanaman V, Sarama J. Cytogenetic effects of *mycoplasmal* infection of cell cultures. *In Vitro* 1984; 20: 1-18.
5. Sokolova IA, Vaug han AT M, Khodarev NN. Mycoplasma infection can sensitize host cells to apoptosis through contribution of apoptotic-like endonuclease(s). *Immunol Cell Biol* 1998; 76: 526-534.
6. Rawadi G, Roman-Roman S, Castedo M, Dutilleul V, Susin S, Marchetti P, Geuskens M, Kroemer G. Effects of *Mycoplasma fermentans* on the myelomonocytic lineage: Different molecular entities with cytokine-inducing and cytocidal potential. J *Immunol* 1996; 156: 670-678.
7. 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.
8. Butler M, Leach RH. A *mycoplasma* which induces acidity and cytopathic effect in tissue culture. *J Gen Microbiol* 1964; 34: 285-294.
9. 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.
10. Tesuguo W. Effects of manganese on growth of Mycoplasma salivarium and Mycoplasma orale. J Clin microbiol 1994; 32:1343-1345.
11. Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures. *Biologicals* 2005; 33:81–85.
12. Razin S. Adherence of pathogenic *Mycoplasma* to host cells. *Biosc Rep* 1997; 19:367-372.
13. Barile MF, Hopps HE, Grabowski MW, Riggs DB, DelGiudice RA. The identification and sources of *mycoplasmas* isolated from contaminated cell cultures. *Ann NY Acad Sci* 1973; 225: 251-264.
14. Hay RJ.Operator-induced contamination in cell culture systems. *Dev Biol Stand* 1991; 75: 193-204.
15. McGarrity GJ, Kotani H. Cell culture mycoplasmas. In:The Mycoplasmas IV. Razin Sand Barile MF(ed). NewYork: *Academic Press, Inc*; 1985; PP: 353-390.
16. Bolske G, Survey of mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1988; 269: 331-340.
17. Crawford Y E. A laboratory guide to the *Mycoplasmas* of human origin. NewYork: *Academic Press, Inc*; 1966; PP: 457-464.
18. Kumagai K, Iwabuchi T, Hinuma Y, Yuri K, Ishida N. Incidence, species, and significance of *Mycoplasma* species in the mouth. *J Infect Dis* 1971; 23:16–21.
19. Leonard H, Robert MC. *Mycoplasmas* spesies of man. *Bacteriological* 1965; 29: 2-13.
20. Shahhosseiny MH, Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by PCR, Tehran, *Islamic Azad University Press*; 1384; PP: 1-30.
21. Gardella RS, Del Giudice RA. Antibiotic sensitivities and elimination of *mycoplasmas* from infected cell cultures. *Isr J Med Sci* 1984; 20:931–934.

22. Uphoff CC, Drexler HG. Prevention of mycoplasma contamination in leukemia-lymphoma cell lines. *Hum Cell* 2001; 14(3): 244-247.
23. Timenetsky J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifogo E. Detection of multiple *mycoplasma* infection in cell cultures by PCR, *Brazillian J Medical and Biological Research* 2006; 39: 907-914.
24. Pourbakhsh S A, Shokri GR, Banani M, Elhamnia F, Ashtari A. Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. *Arch of Razi Inst* 2010; 65: 75-81.
25. Van-kuppeveld FJ, Vanderlogt JT, Angulo AF, Van-Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, *et al*. Genus and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2606-2615.
26. Dussurget O, Dussiox DR. Rapid and sensitive PCR-based detection of *Mycoplasmas* in simulated samples of animal sera. *Appli Environ Microbiol* 1994; 60: 953-959.
27. Gabridge MG, Lundin DJ. Optimal culture conditions for detection and isolation of *Mycoplasma* contaminants from cell cultures. Recent Advances in Mycoplasmology: *Proceedings of the 7th Congress of the International Organization for Mycoplasmology* 1990; PP: 943-944
28. Hay RJ, Macy ML, Chen TR. *Mycoplasma* infection of cultured cells. *Nature* 1989; 339: 487-488.
29. European Pharmacopeia. *Biological Tests Mycoplasmas*, 4th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing 2002; PP: 128-131.
30. 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: 335-341.
31. Somerson N, Cook MK. Virus growth in tissue cultures suppression of *Rous Sarcoma* by *Mycoplasma orale. J Bacteriol* 1965*;* 90:534-539.
32. Uphoff CC, Merkhoffer Y, Drexler HG. A new method for the rapid detection of *mycoplasma* contaminations in leukemia cell lines. *J Hematol* 2003; 4(2):16-18.
33. Uphoff CC, Drexler HG. Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2011; 731: 93-103.
34. Zhi Y, Mayhew A, Seng N, Takle GB. Validation of a PCR method for the detection of *mycoplasmas* according to European Pharmacopoeia section 2.6.7. *Biologicals* 2010; 38: 232-237.
35. Dvorakova H, valicek L, reichelova M. Detection of *mycoplasma* contamination in cell cultures and bovine sera. *Vet Med- Czech* 2005; 50: 262–268.
36. Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR. Detection of *Mycoplasma* in cell cultures, *Nature Protocols* 2010; 5: 929 –934.
37. McGarrity GJ, Sarama J, Vanaman V. Cell culture techniques. *ASM News* 1985; 51:170-183.