Short Communication

Detection of *Mycoplasma salivarium* Contamination in Cell Culture using PCR Method

Visat Rostamizadeh[1], Seyed Ali Pourbakhsh[2]*, Esmaeil Asli[3], Azam Hadadi[4]

1- M.Sc. Student, Department of Microbiology, Karaj Branch of Islamic Azad University, Karaj, Iran
2- Associated Professor, Mycoplasma Referance Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Mycoplasma Referance Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
4- Assistant Professor, Department of Microbiology, Karaj Branch of Islamic Azad University, Karaj, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 3197619751, Mycoplasma Referance Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*
Email: a.pourbakhsh@rvsri.ac.ir

Received: 21/May/2013, Accepted: 04/Dec/2013

Abstract

Objective: *Mycoplasma salivarium (M. salivarium)* is one of the most common contaminants present in cell culture laboratories that cause undesirable effects on cell cultures. Thus, the identification and rapid diagnosis in controlling and prevention of this contaminant are important. The aim of this study is the detection of *Mycoplasma salivarium* contamination in cell culture using polymerase chain reaction (PCR) method.
Methods: A 16S rRNA-based Mycoplasma genus and specific primer PCR method for *M. salivarium* was developed. The sensitivity and specificity of this method were determined. The PCR test was used after we extracted DNA from the cultured isolates.
Results: A total of 62 cell culture samples were sent to the Mycoplasma Reference Laboratory at Razi Institute, Karaj, Iran for detection of Mycoplasma contamination. A total of 42 (67.75%) out of 62 samples scored positive according to the Mycoplasma genus. From these 42 samples, 15 (35.72%) reacted positively with a clear band of 434 bp in the *M. Salivarium*-specific PCR method.
Conclusion: Due to the high percentage of *M. salivarium* contamination in cell cultures, we recommend aseptic conditions be used in the laboratory when working with cell cultures. The PCR method is a suitable and valuable tool for the detection of *M. salivarium* contamination in cell cultures with appropriate and specific primers. This PCR method can be processed in less than one day.

Keywords: *Mycoplasma salivarium,* PCR, Contamination, Cell culture

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 3, Autumn 2013, Pages: 109-118

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

مقاله کوتاه

شناسایی آلودگی مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی با استفاده از روش PCR

ویستا رستمی‌زاده[1]، سیدعلی پوربخش[2*]، اسماعیل اصلی[3]، اعظم حدادی[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج، ایران
۲- دانشیار، آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۳- استادیار، آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۴- استادیار،گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، کرج، کدپستی ۳۱۹۷۶۱۹۷۵۱، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما
Email: a.pourbakhsh@rvsri.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۲/۰۲/۳۱ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۹/۱۳

چکیده

هدف: مایکوپلاسما سالیواریوم یکی از گونه‌های مایکوپلاسمای اصلی آلوده کننده کشت‌های سلولی محسوب می‌شود و می‌تواند آثار نامطلوبی را روی کشت‌های سلولی ایجاد کند؛ در نتیجه شناسایی این آلودگی و سرعت تشخیص آن، در کنترل و پیشگیری از این موضوع اهمیت دارد. هدف از این مطالعه شناسایی آلودگی مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی با استفاده از روش واکنش زنجیره پلیمرازی (PCR) بود.

مواد و روش‌ها: به منظور راه‌اندازی PCR از سویه استاندارد مایکوپلاسما سالیواریوم و آغازگرهای اختصاصی این گونه براساس تکثیر قطعه‌ای از ژن 16SrRNA استفاده شد و در ادامه حساسیت و ویژگی این آزمون تعیین شد. نمونه‌های مورد بررسی پس از استخراج DNA، از نظر آلودگی به جنس مایکوپلاسما و گونه سالیواریوم مورد آزمایش PCR قرار گرفتند.

نتایج: در این مطالعه تعداد ٦٢ نمونه از کشت‌های سلولی ارسالی به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما در مؤسسه رازی مورد بررسی قرار گرفتند که از این تعداد ٤٢ (٦٧/٧٥ درصد) نمونه از نظر آلودگی به جنس مایکوپلاسما و از این تعداد ١٥ (٣٥/٧٢ درصد) نمونه با ایجاد باند در ٤٣٤ جفت باز از نظر آلودگی به گونه مایکوپلاسما سالیواریوم مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به بالا بودن درصد آلودگی کشت‌های سلولی به مایکوپلاسما سالیواریوم، رعایت شرایط آسپتیک توسط پرسنل آزمایشگاه در مراحل آماده‌سازی و کار با کشت‌های سلولی توصیه می‌شود. ضمناً با بهره‌گیری از آغازگرهای مناسب و اختصاصی امکان شناسایی و تشخیص آلودگی به مایکوپلاسما سالیواریوم در آزمایشگاه‌های کشت سلولی، در کمتر از یک روز با استفاده از روش PCR امکان‌پذیر است.

کلیدواژگان: مایکوپلاسما سالیواریوم، PCR، آلودگی، کشت سلول

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۳ پاییز ۱۳۹۲، صفحات: ۱۰۹-۱۱۸

مقدمه

مایکوپلاسماها (*Mycoplasma*) کوچک‌ترین باکتری‌های فاقد دیواره سلولی بوده و در کلاس مولیکوتس (Molicut)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

قرار دارند. آن‌ها باکتری‌هایی با تنوع شکلی زیاد، بی‌هوازی اختیاری، دارای زندگی آزاد و عموماً کند رشد هستند و یکی از مهم‌ترین آلوده کننده‌های کشت سلولی محسوب می‌شوند، همچنین حضور این آلودگی‌ها در کشت‌های سلولی می‌تواند عوارض شدیدی روی ساختار و عملکرد کلیدی سلول میزبان داشته باشد [۱-٤]. همچنین از نظر اقتصادی نیز زیان‌هایی را به دنبال دارد؛ از جمله می‌توان به از دست دادن زمان، هزینه و تلاش‌های انجام شده، از دست دادن سلول‌های ارزشمند، نتایج گمراه کننده، تأثیر روی اعتبار و اهمیت اطلاعات حاصل از تحقیق انجام شده، آثار منفی روی کیفیت و کمیت سلول‌های مورد استفاده در ساخت واکسن، اینترفرون (Interferon)، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (Monoclonal Antibodies)، پروتئین‌های نوترکیب و سایر داروهای مربوطه اشاره کرد [۲، ۵]. مشکل آلودگی مایکوپلاسمایی در حال حاضر به طور گسترده در ۱۵ تا ۸۰ درصد کشت‌های سلولی گزارش شده است [٦]. در نتیجه شناسایی این آلودگی، سرعت تشخیص آن در کشت سلولی و دسترسی به یک روش شناسایی قطعی و قابل اتکا که بتواند در پژوهش‌های آزمایشگاهی متداول به کار آید، در کنترل و پیشگیری از این موضوع حایز اهمیت است. تاکنون بیش از ۲۰ گونه مایکوپلاسما متفاوت را از کشت‌های سلولی جداسازی کرده‌اند که می‌توانند منشأ انسانی یا حیوانی داشته باشند [٦] که در این میان هفت گونه مایکوپلاسما هیورینیس (*M. hyorhinis*)، مایکوپلاسما آرژنینی (*M. arginini*)، مایکوپلاسما سالیواریوم (*M. salivarium*)، مایکوپلاسما اوراله (*M. orale*)، مایکوپلاسما فرمنتانس(*M. fermentans*)، آکولوپلاسما لایدلاوی (*Acholeplasma laidlawii*) عامل بیش از ۹۵ درصد آلودگی در کشت‌های سلولی هستند [۷]. مایکوپلاسما سالیواریوم یکی از معمولی‌ترین فلورهای طبیعی حفره دهانی انسان بوده که می‌توان از ٦۰ تا ۸۰ درصد نمونه‌های گلوی افراد جداسازی کرد و با توجه به این‌که مایکوپلاسماها با منشأ انسانی نقش بارزی در آلودگی کشت‌های سلولی بازی می‌کنند، احتمال حضور این عامل در آلودگی‌های محیط‌های کشت سلول از نظر ارتباط مستقیم پرسنل با محیط‌های کشت سلول قابل توجه است [۸، ۹]. شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی با استفاده از روش‌های کشت میکروبی، رنگ‌آمیزی، میکروسکوپ الکترونی، آزمون‌های بیوشیمیایی و ایمنولوژیکی معمولاً وقت‌گیر، با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و همین طور تجربه کافی برای تفسیر نتایج است و از آن‌جایی که سرعت تشخیص آلودگی مایکوپلاسما در کنترل و پیشگیری از این موضوع نقش شایانی دارد، در سال‌های اخیر با استفاده از روش‌های مولکولی، شناسایی جنس و گونه مایکوپلاسماهای مختلف با بهره‌گیری از آغازگرهای (Primers) مناسب و اختصاصی به تشخیص سریع‌تر (در کمتر از یک روز کاری) با هزینه کمتر و حساسیت بیشتر این آلودگی‌ها کمک شایانی نماید که از این توانایی می‌توان برای شناسایی مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی مشکوک به آلودگی با مایکوپلاسما بهره جست [۵، ۱۰]. در زمینه شناسایی و تشخیص مولکولی مایکوپلاسما سالیواریوم از محیط‌های کشت سلول به روش مولکولی در ایران تاکنون مطالعه مدون و قابل ذکری مشاهده نشده است؛ از این لحاظ این پژوهش کاملاً جدید است و از آن‌جا که پیشگیری در رأس برنامه‌های کنترلی قرار دارد و همچنین سرعت تشخیص آلودگی محیط کشت سلولی به مایکوپلاسما سالیواریوم در کنترل و پیشگیری از این موضوع نقش شایانی دارد؛ به این منظور در این تحقیق آلودگی مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسمای مؤسسه رازی با استفاده از روش PCR با حساسیت و ویژگی مناسب مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

در این مطالعه از مایکوپلاسما سالیواریوم، مایکوپلاسما اوراله، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما آرژنینی، آکولوپلاسما لایدلاوی، مایکوپلاسما فرمنتانس و مایکوپلاسما

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

پنومونیه (*M. pneumoniae*) به عنوان کنترل استفاده شد.

کشت های سلولی

در این مطالعه تعداد ٦٢ نمونه کشت سلولی ارسالی به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما در مؤسسه رازی از نظر آلودگی به مایکوپلاسما سالیواریوم با استفاده از روش PCR بررسی شدند.

استخراج DNA

DNA ژنومیک گونه‌های مایکوپلاسما با استفاده از روش فنل- کلروفرم استخراج شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از کشت‌های سلولی به تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس با استفاده از روش فنل- کلروفرم طبق دستورالعمل استاندارد شده استخراج DNA انجام شد [۱۱].

آغازگرها

آغازگرهای اختصاصی در PCR به منظور شناسایی جنس مایکوپلاسما با محصول و باند اختصاصی ۲۷۰ جفت بازی استفاده شد [۱۲].

.GPO_3: 5´-GGG AGC AAA CAC GAT AGA TAC CCT-3´

.MGSO: 5´-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3´

آغازگرهای اختصاصی در PCR به منظور شناسایی گونه مایکوپلاسما سالیواریوم براساس توالی ژن 16S rRNA با محصول و باند اختصاصی ٤٣٤ جفت بازی استفاده شد [۱۳].

.MSAL F:

5´-ATGGATTGTAAAGTGCTGTTGCTAG-3´

MSAL R:.

5´-GCGTCAACAGTTCTCTGCCG-3´.

برای راه‌اندازی این آزمون، واکنش PCR روی DNA استخراجی از نمونه کنترل مثبت مایکوپلاسما سالیواریوم انجام گرفت که در این واکنش از آغازگرهای اختصاصی این گونه (MSAL F-R) معرفی شده در مطالعه تیمنتسکی (Timenetsky) در سال ۲۰۰٦ براساس توالی قطعه‌ای از ژن 16S rRNA استفاده شد. در فرمول و برنامه این واکنش چندین بار تغییراتی به منظور مشاهده تک باند اختصاصی مایکوپلاسما سالیواریوم در ٤٣٤ جفت باز و حذف باندهای اختصاصی داده شد که در نهایت این آزمون با فرمول و برنامه‌ای که در ادامه گفته شده است، انجام گرفت.

شرایط PCR

به منظور شناسایی جنس مایکوپلاسما با استفاده از روش PCR، هر کدام از اجزای مخلوط برای هر نمونه شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر ۱۰X، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای GPO_3 و MGSO، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* (۵ واحد)، ۲ میکرولیتر DNA بود و حجم نهایی هر نمونه با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و برنامه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد ٤ دقیقه برای یک چرخه، ۹٤ درجه سانتی‌گراد ٤۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد ٦۰ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه طی ٤۰ چرخه PCR و پلیمرازسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه بود. به منظور شناسایی مایکوپلاسما سالیواریوم با استفاده از روش PCR، هر کدام از اجزای مخلوط برای هر نمونه شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۱۲ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرهای MSAL R و MSAL F، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم *Taq* (۵ واحد)، ۲ میکرولیتر DNA بود و حجم نهایی هر نمونه با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و برنامه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه برای یک چرخه، ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد ٤۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ٦۰ ثانیه طی ۳۵ چرخه PCR و پلیمرازسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه بود. در این مطالعه محصولات PCR در کنار نشانگر اندازه، کنترل مثبت و منفی با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

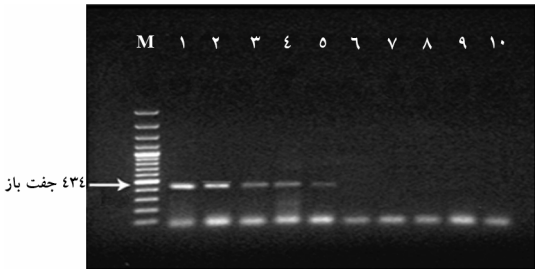
و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) و در زیر نور ماورای بنفش بررسی شدند.

حساسیت و ویژگی

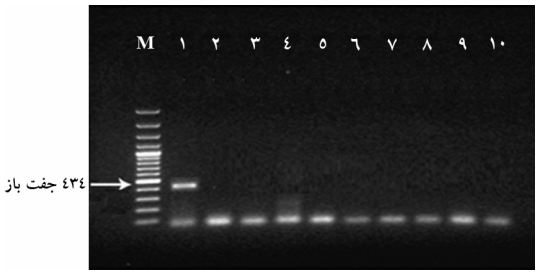
برای بررسی حساسیت جفت آغازگرهای مورد استفاده از DNA نمونه کنترل مثبت مایکوپلاسما سالیواریوم استفاده شد و از آن در پایه ۱۰ لگاریتمی ۱۰ تیوپ مجزا رقت‌سازی انجام گرفت. سپس واکنش PCR طبق برنامه و فرمول ذکر شده انجام شد. همچنین برای بررسی ویژگی جفت آغازگرهای PCR، از مایکوپلاسما سالیواریوم استاندارد به عنوان کنترل مثبت و مایکوپلاسما اورالـه، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما آرژنینی، آکولوپلاسما لایدلاوی، مایکوپلاسما فرمنتانس، مایکوپلاسما پنومونیه، اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) و استرپتوکوکوس پنومونیه (*Streptococcus pneumoniae*) استفاده شد؛ سپس واکنش PCR گونه مایکوپلاسما سالیواریوم انجام گرفت.

نتایج

با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه مایکوپلاسما سالیواریوم آزمون PCR با تغییرات اعمال شده انجام شد و تک باند اختصاصی در ناحیه ٤٣٤ جفت باز مشاهده شد. به منظور تأیید قطعی آزمون راه‌اندازی شده یک نمونه از محصول این آزمون برای تعیین توالی به شرکت WMG آلمان ارسال و سپس توالی آن با مایکوپلاسما سالیواریوم استاندارد ثبت شده در بانک ژن مقایسه و بررسی شد. سپس نتیجه حاصل در بانک ژن روی سایت NCBI با کد MSAR-2 JX 233552 ثبت شد. برای تعیین ویژگی PCR از DNA مایکوپلاسما اورالـه، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما آرژنینی، آکولوپلاسما لایدلاوی، مایکوپلاسما فرمنتانس، مایکوپلاسما پنومونیه، اشریشیا کلی و استرپتوکوکوس پنومونیه استفاده شد که جفت آغازگرهای اختصاصی با هیچ‌یک از DNA این باکتری‌ها واکنش مثبت نداد که نشان دهنده ویژگی بالای این آزمون بود. جفت آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در واکنش PCR مربوط به شناسایی مایکوپلاسما سالیواریوم دارای حساسیتی به میزان ٤/٦ به ازای هر پیکوگرم نمونه اولیه بود. در این مطالعه تعداد ٦٢ نمونه کشت سلولی مورد بررسی با استفاده از روش فنل- کلروفرم استخراج شد و در ادامه از نظر آلودگی به جنس مایکوپلاسما با استفاده از واکنش PCR بررسی شدند که در این میان تعداد ٤٢ نمونه از ٦٢ نمونه مورد بررسی (٦٧/٧٥ درصد) از نظر آلودگی به جنس مایکوپلاسما مثبت بودند. سپس نمونه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به گونه مایکوپلاسما سالیواریوم بررسی شدند که در این میان تعداد ١٥ نمونه از ٤٢ نمونه مورد بررسی (٣٥/٧٢ درصد) از نظر آلودگی به مایکوپلاسما سالیواریوم مثبت بودند.

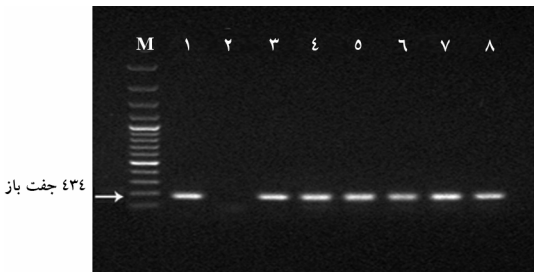


شکل ۱ بررسی محصول PCR در آزمایش تعیین حساسیت؛ M: نشانگر (خط کش ژنی ١٠٠ جفت بازی)، ردیف ١) کنترل منفی، از ردیف ١ تا ١٠) به ترتیب رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4} و .... 10^{-9}

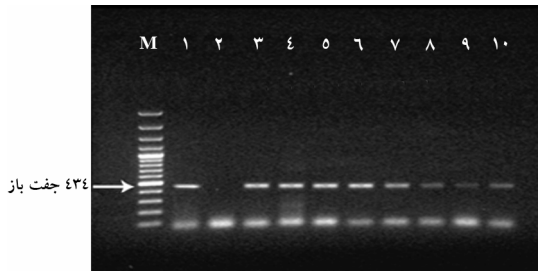


شکل ۲ بررسی محصول PCR در آزمایش ویژگی؛ M) نشانگر (خط کش ژنی ١٠٠ جفت بازی)، ردیف ١) کنترل مثبت (گونه مایکوپلاسما سالیواریوم)، ردیف ٢) کنترل منفی، ردیف‌های ٣-٨) به ترتیب نمونه‌های مایکوپلاسما سالیواریوم، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما آرژنینی، آکولوپلاسما لایدلاوی، مایکوپلاسما فرمنتانس، مایکوپلاسما پنومونیه، اشریشیا کلی و استرپتوکوکوس پنومونیه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]



شکل ۳ بررسی محصول PCR جنس مایکوپلاسما در نمونه‌های مورد آزمایش؛ M) نشانگر (خط کش ژنی ۱۰۰ جفت بازی)، ردیف ۱) کنترل مثبت (باند نمونه استاندارد MS-NCTC 10124-05 در ناحیه ۲۷۰ جفت باز)، ردیف ۲) کنترل منفی، ردیف ۳–۸) نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه



شکل ٤ بررسی محصول PCR گونه مایکوپلاسما سالیواریوم در نمونه‌های مورد آزمایش؛ M) نشانگر (خط کش ژنی ۱۰۰ جفت بازی)، ردیف ۱) کنترل مثبت (گونه مایکوپلاسما سالیواریوم در ناحیه ٤۳٤ جفت باز)، ردیف ۲) کنترل منفی، ردیف ۳–۱۰) نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه

بحث

در این مطالعه برای بررسی و شناسایی آلودگی مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسمای مؤسسه رازی، روش PCR با حساسیت و ویژگی مناسب راه‌اندازی شد و نشان داده شد که کشت‌های سلولی ارجاعی با درصد بالایی به مایکوپلاسما سالیواریوم آلوده بودند.

مایکوپلاسماها یکی از مهم‌ترین آلوده کننده‌های کشت سلولی محسوب می‌شوند. مایکوپلاسماها فاقد مسیرهای آنزیمی برای سنتز پورین‌ها و پیریمیدین‌ها هستند. آن‌ها باکتری‌های بسیار سخت رشد با نیازمندی‌های رشدی بسیار زیاد هستند که با زندگی درون سلول میزبان کلسترول، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب و حتی DNA مورد نیاز خود را از سلول میزبان تأمین می‌کنند [١٤]. بر مبنای چنین ویژگی‌ها و نیازهایی این میکروارگانیسم‌ها یکی از عوامل اصلی و مهم آلودگی در کشت سلولی و فرآورده‌های زیستی حاصل در آن محسوب می‌شوند، آن‌ها به عنوان آلوده کننده در کشت‌های سلولی بسیار آرام رشد کرده و فاقد آثار عمومی قابل مشاهده در کشت‌های سلولی مانند تغییر رنگ محیط و کدورت آن هستند؛ بنابراین تشخیص این نوع آلودگی مشکل‌تر است. همچنین حضور این آلودگی می‌تواند عوارض شدیدی روی ساختار و عملکرد کلیدی سلول میزبان و نتایج آزمون‌های زیستی و آزمون‌های تشخیصی انجام شده در کشت سلول داشته باشد و از نظر اقتصادی نیز زیان‌هایی را به دنبال دارد؛ در نتیجه شناسایی آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است.

روش ایده‌آل برای شناسایی این نوع آلودگی اغلب باید دارای حساسیت و ویژگی بالا، همچنین ساده، سریع و مؤثر با هزینه مناسب باشد. بررسی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی با استفاده از روش کشت، وقت‌گیر (چندین هفته) با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و همین طور تجربه کافی برای تفسیر نتایج است. روش‌های دیگر از جمله بررسی میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی مستقیم DNA با رنگ فلورسنس (DAPI , Hoechst 33258) [١٥، ١٦]، بررسی خواص متابولیکی و بیوشیمیایی نیز دارای مشکلاتی از جمله صرف زمان زیاد، حساسیت و معمولاً ویژگی پایین است [٦، ١٧]. بنابراین اکثریت روش‌های در دسترس برای شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی مناسب نیستند. برای غلبه بر این مشکلات، روش‌های مولکولی مانند PCR در سال‌های اخیر توسعه فراوانی یافته است. با استفاده از این روش‌ها، شناسایی جنس و گونه مایکوپلاسماهای مختلف با بهره‌گیری از آغازگرهای مناسب و اختصاصی در کمتر از یک روز کاری امکان‌پذیر است و استفاده از این روش می‌تواند به تشخیص سریع‌تر با هزینه کمتر و حساسیت بیشتر این آلودگی‌ها کمک شایانی نماید که از این توانایی می‌توان برای شناسایی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی مشکوک به آلودگی با مایکوپلاسما بهره جست [۵، ۱۰، ۱٤، ۱۸، ۱۹].

مایکوپلاسما سالیواریوم یکی از گونه‌های اصلی آلوده کننده کشت‌های سلولی محسوب می‌شود. این باکتری یکی از معمول‌ترین فلورهای طبیعی حفره دهانی انسان بوده که می‌توان از ٦۰-۸۰ درصد نمونه‌های گلوی افراد بالغ جداسازی کرد و با توجه به شیوع بالای این مایکوپلاسما به عنوان فلور طبیعی در حفره دهانی نسبت به سایر مایکوپلاسماهای انسانی آلوده کننده کشت سلولی و از آن‌جایی که مایکوپلاسماها با منشأ انسانی نقش بارزی در آلودگی کشت‌های سلولی بازی می‌کنند، احتمال حضور این آلودگی توسط پرسنل آزمایشگاه با توجه به ارتباط مستقیم‌شان با محیط‌های کشت سلول قابل توجه است [۱، ۲۰].

در مطالعه انجام شده توسط شاه‌حسینی در سال ۱۳۸۷، ۵۳ درصد از کشت‌های سلولی مورد بررسی با استفاده از روش PCR، از نظر آلودگی به جنس مایکوپلاسما مثبت اعلام شدند. چندین مطالعه به منظور شناسایی آلودگی مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی با استفاده از روش PCR و با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی بر اساس سکانس قطعه ای از ژن 16S rRNA در کشورهای مختلف انجام گرفته است. در مطالعه توسط تیمنتسکی (Timenetsky) در سال ۲۰۰٦، ۸ درصد از کشت‌های سلولی از نظر آلودگی به مایکوپلاسما سالیواریوم مثبت بودند [۱۳]. در این مطالعه از آغازگرهای اختصاصی معرفی شده توسط تیمنتسکی استفاده شد. در مطالعات دیگر توسط لوبو (Lobo) در آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما در کوبا طی سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۵، ۲ درصد و طی سال‌های ۱۹۹۲- ۲۰۰۲، ۵ درصد از کشت‌های سلولی از نظر آلودگی به مایکوپلاسما سالیواریوم مثبت بودند [۲۱]. اگر چه در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در کشورهای مختلف برای شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی از جمله مایکوپلاسما سالیواریوم انجام شده است ولی تاکنون در زمینه شناسایی و تشخیص مولکولی این گونه در کشت‌های سلولی در ایران مطالعه منتشر شده‌ای وجود ندارد. بر این اساس مطالعه‌ای به منظور شناسایی این آلودگی در کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسمای مؤسسه رازی انجام شد.

در این مطالعه امکان شناسایی آلودگی مایکوپلاسما سالیواریوم در کشت‌های سلولی با استفاده از یک روش قابل اعتماد و کاملاً اختصاصی بر مبنای کاربرد روش مولکولی PCR و به کارگیری این روش به طور روتین در آزمایشگاه‌های کشت سلولی بررسی شد. در این مطالعه آغازگرهای اختصاصی گونه سالیواریوم معرفی شده توسط تیمنتسکی براساس توالی قطعه‌ای از ژن rRNA 16S به کار گرفته شد و با ایجاد تغییراتی در میزان مواد مورد استفاده و زمان مراحل مختلف، واکنش PCR انجام و در ادامه حساسیت و ویژگی آن تعیین شد.

در مطالعه حاضر از ٦۲ نمونه مورد بررسی، تعداد ٤۲ نمونه (٦۷/۷۵ درصد) از نظر آلودگی به جنس مایکوپلاسما مثبت بودند و از این تعداد، ۱۵ نمونه (۳۵/۷۲ درصد) از نظر آلودگی به مایکوپلاسما سالیواریوم مثبت بودند. حساسیت این آزمون با آغازگرهای اختصاصی مایکوپلاسما سالیواریوم به میزان ٦/٤ پیکوگرم به ازای هر میکرولیتر نمونه اولیه بود. حساسیت این آغازگرها در مطالعه تیمنتسکی برابر با ۱ پیکوگرم به ازای هر میکرولیتر نمونه اولیه و با ویژگی بالا بیان شده است. برای تعیین ویژگی آزمون PCR از DNA مایکوپلاسما سالیواریوم، مایکوپلاسما اورالـه، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما آرژنینی، آکولوپلاسما لایدلاوی، مایکوپلاسما فرمنتانس، مایکوپلاسما پنومونیه، اشریشیا کلی و استرپتوکوکوس پنومونیه استفاده شد که جفت آغازگرهای اختصاصی با هیچ‌یک از DNA این باکتری‌ها به جز مایکوپلاسما سالیواریوم واکنش مثبت نداد که نشان دهنده ویژگی بالای این آزمون بود.

براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق میزان آلودگی کشت‌های سلولی به جنس مایکوپلاسما با نتایج به دست آمده از تحقیق انجام شده توسط شاه‌حسینی مطابقت دارد و نتایج به دست آمده از میزان آلودگی کشت‌های سلولی به مایکوپلاسما سالیواریوم

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

در این مطالعه نسبت به مطالعات انجام شده توسط تیمنتسکی و همچنین مطالعات دیگر در سال‌های پیش و در کشورهای مختلف بیشتر بود. بالا بودن درصد این آلودگی در کشت‌های سلولی می‌تواند در اثر نامناسب بودن شرایط آزمایشگاه و رعایت نکردن شرایط آسپتیک توسط پرسنل آزمایشگاه در مراحل آماده‌سازی و کار با کشت سلولی باشد [٤، ١٤، ٢٢].

به طور کلی در این مطالعه روش PCR برای شناسایی مایکوپلاسما سالیواریوم برای اولین بار راه‌اندازی شد که می‌تواند برای بررسی آلودگی مایکوپلاسما سالیواریوم در آزمایشگاه‌های کشت سلولی مورد استفاده قرار گیرد. ضمن استفاده از این روش با حساسیت و ویژگی مناسب نشان داده شد که میزان قابل توجهی از کشت‌های سلولی ارجاعی به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما در مؤسسه رازی آلوده به مایکوپلاسما سالیواریوم بودند. با توجه به این که تعداد معدودی از نمونه‌ها و در فاصله زمانی محدود از لحاظ آلودگی به مایکوپلاسما سالیواریوم مورد بررسی قرار گرفته بودند، با انجام مطالعه گسترده‌تر و تعداد نمونه‌های بیشتر می‌توان با اطمینان بیشتر به حساسیت و ویژگی آزمون راه‌اندازی شده تکیه کرد. همچنین می‌توان با بهره‌گیری از آغازگرهای مناسب و اختصاصی نسبت به شناسایی گونه‌های دیگر مایکوپلاسمایی که آلوده کننده نمونه‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر بودند، 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 که بدین‌وسیله 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 آقایان دکتر عباس اشتری، دکتر علی‌رضا آبتین، مهدی حمزه و سرکار خانم سلیمه آهنگران و تمامی کارکنان و همکاران آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج سپاسگزاری می‌شود.

منابع

[1] Arai S, Harasawa R, Ohno T, Takeuchi M, Hikiji K, Sato S, Kobayashi N, Asada K, Takagi K, Lee IE, Kato K, Furudera T. "Japan Bioindustry Association (JBA) is Validating Standard Methods for the Detection of Mycoplasmas" 1992; Beijin 7th ICCC

[2] Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. Biologicals 2005; 33(2): 81-5.

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

[4] Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, MacLeod RA, Quentmeier H, Steube K, Tümmler M, Voges M, Wagner B, Drexler HG. Sensitivity and specificity of five different *Mycoplasma* detection assays. Leukemia 1992; 6(4): 335-41.

[5] Mardassi BB, Mohamed RB, Gueriri I, Boughattas 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(2): 948-58.

[6] Drexler HG, Uphoff CC. *Mycoplasma*

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. Cytotechnology 2002; 39(2): 75-90.

[7] Swayne DE, Glisson RJ, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM. A laboratory manual for the isolation and indntification of avian pathogens. 4th Edition, Washington: The American Association of pathologist, 1998; p: 74-80.

[8] Engel LD, Kenny GE. *Mycoplasma salivarium* in human gingival sulci. J Periodontal Res 1970; 5(3): 163-71.

[9] Tully JG. Current status of the mollicute flora of humans. Clin Infect Dis 1993; 17 Suppl 1: S2-9.

[10] Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Ishiko H. Phylogeny-based rapid identification of *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* from urethritis patients. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 105-10.

[11] Pourbakhsh SA, Shokri GR, Banani M, Elhamnia F, Ashtar A. Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. Arch Razi Inst 2010; 65(2): 75-81.

[12] van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, Galama JM, Melchers WJ. Genus-and species-specific identification of *Mycoplasma* by 16S rRNA amplification. Appl Environ Microbiol 1992; 58(8): 2606-15.

[13] 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(7): 907-14.

[14] Watanabe T. Biological and serological studies on oral *Mycoplasma*. Bull Tokyo Med Dent Univ 1967; 14(4): 447-60.

[15] McGarrity GJ, Vanaman V, Sarama J. Cytogenetic effects of mycoplasmal infection of cell cultures: a review. In Vitro 1984; 20(1): 1-18.

[16] Wirth M, Berthold E, Grashoff M, Pfutzner H, Schubert U, Hauser H. Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction.Cytotechnology 1994; 16 :67-77.

[17] Somerson NL, Cook MK. Suppression of rous sarcoma virus growth in tissue cultures by *Mycoplasma orale*. J Bacteriol 1965; 90: 534-40.

[18] Ryan J. Understanding and Managing Cell Culture Contamination Corning, Inc. Technical Bulletin, Corning Life Sciences 2002; Available at: www.corning.com/lifesciences.

[19] Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(4): 1094-156.

[20] Watanabe T, Matsuura M, Seto K. Enumeration, isolation, and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*). J Clin Microbiol 1986; 23(6): 1034-8.

[21] Lobo E, Chávez Y, Fernández C, Martinez S, Martinez A. *Mycoplasma* control in biopharmaccutical processing: Experience of *Mycoplasma* diagnostic incoba. 14 International congress of the international organization for myplas mology (IOM), Vienna, Austria 2002. Available at: http://vmutpp.vu-wien.ac.at/vuw/fodok/suche.publikationen_suchergebnis

[22] Harasawa R. Nested PCR: Application to the detection of *Mycoplasmas*. In: Razin S, Tully

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]

JG, (Editors). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology. London: Academic Press, 1995; p: 710-5.

[23] Agarwal P, Searls DB. Can literature analysis identify innovation drivers in drug discovery? Nat Rev Drug Discov 2009; 8(11): 865-78.

[24] Freshney RI. Culture of Animal Cells. Chapter 8, 5th Edition, New York: Wiley-Liss, 2005.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2025-05-18]