جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۷، صفحات ۲۵- ۱۵

تشخیص آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت سلول به روش *PCR*

محمدحسن شاه حسینی[۱*]، زهرا حسینی[۱و۲]، بهمن تبرائی [۲] ، فاطمه اخلاقی[۳]، محمد علی شکرگزار[۴] ، الهام مسلمی[۵]

۱) دانشگاه آزاد اسلامی. واحد شهریار/شهر قدس، گروه میکروبیولوژی
۲) دانشگاه آزاد اسلامی. واحد کرج، گروه میکروبیولوژی
۳) موسسه رازی/ حصارک کرج - بخش کنترل کیفی
۴) انستیتو پاستور ایران-بخش بانک سلول
۵) دانشگاه آزاد اسلامی.واحد تهران شرق-گروه زیست شناسی
نویسنده رابط: محمدحسن شاه حسینی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/شهر قدس گروه میکروبیولوژی shahhosseiny@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۷/۸/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله :۸۷/۱۲/۲۶

چکیده:

مقدمه و اهداف: آلودگی کشت های سلولی در شرایط آزمایشگاه با گونه های مایکوپلاسما می تواند به مشکلاتی در ارگانیسم های زنده منجر شود. بنابراین، تهیه یک پروتکل تشخیص روتین برای عفونت های مایکوپلاسمایی، جهت به دست آوردن نتایج تحقیقاتی قابل اعتماد، ضروری و انکارناپذیر است. به دلیل محدودیت در روش های متواتر، این اواخر تکنولوژی هایی بر پایه اسید نوکلئیک خصوصا روش های بر پایه واکنش زنجیره ای پلیمراز *(PCR)* برای شناسایی و تشخیص تمامی گونه های جنس مایکوپلاسما، به عنوان روشی سریع و ویژه ارائه شده اند. هدف از انجام این مطالعه ارائه روشی بر پایه *PCR* جهت آشکار کردن مایکوپلاسماها در نمونه های کشت سلولی و سایر فرآورده های بیولوژیک مانند واکسن ها بود.

روش بررسی: با استفاده از پرایمرهای مخصوص جنس *SHAH-GPO-3* و *MGSO* و گونه های استاندارد، روش *PCR* بهینه شد و از جهت حساسیت و ویژگی بررسی گردید. سپس از کشت های سلولی *DNA* استخراج و با *PCR* آزمایش شد. محصول تکثیری کلون و تعیین توالی گردید.

یافته ها: در این مطالعه، روش حساسی از *PCR* تهیه و جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما در آلودگی های فرآورده های بیولوژیک توسعه داده شد. ژن *16S rDNA* به دلیل داشتن سکانس های مشترک و ثابت به عنوان ژن هدف، جهت تکثیر با پرایمرهای تغییر یافته مورد استفاده قرارگرفت. این روش حساس توسعه داده شده، با محصولی به اندازه *bp* ۲۷۲، دارای حساسیتی در حد ۱۰ کپی از *DNA* ژنوم هدف بوده و با *DNA* بسیاری از میکروارگانیسم ها، رده های سلولی انسان، واکنش متقاطع ندارد. از این جهت، پرایمرها دارای حساسیت و ویژگی فوق العاده بالایی هستند.

نتیجه گیری: سنجش *PCR* بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک موجود در *۱۶S rRNA*، یک تکنیک مفید، قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی، و دقت بالا جهت شناسایی آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت سلول و سایر فرآورده های بیولوژیک است. البته تحقیقات بیشتری در زمینه استخراج *DNA* ، روش های تغلیظ نمونه، سکانس های هدف، روش شناسایی محصول تکثیری بایدانجام گیرد.

کلید واژه ها : مایکوپلاسما، *PCR* ، آلودگی، تشخیص مولکولی، کشت سلول

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه:

مایکوپلاسماها یکی از کوچکترین میکروارگانیسم های زنده آزاد و توانا در خود تکثیری هستند. این باکتری ها مهم ترین و جدی ترین آلوده کننده های کشت سلول، فرآورده های بیولوژیک و بیوتکنولوژیک تولیدی در کشت های سلولی، و مخرب نتایج آزمون های بیولوژیک و تست های تشخیصی هستند که در کشت سلولی انجام می شود. مشکل آلودگی در حال حاضر به طور گسترده ای در ۱۵ الی ۸۰ درصد کشت های سلولی، بسته به رده سلولی، آزمون مورد استفاده، و کیفیت تست های کنترل کیفی، گزارش شده است(۲و۱). ۵ گونه *مایکوپلاسما آرجینینی* (*Mycoplasma arginini*) ، *اکولپلاسما لیدلاوی*(*Acholplasma laidlawi*) ، *مایکوپلاسما هیورینیس*(*M. hyorhinis*) ، *مایکوپلاسما اورال*(*M. Orale*) و *مایکوپلاسما فرمنتاس*(*M. fermentans*) عامل بیش از ۹۵٪ آلودگی های کشت سلولی است(۵-۳). مشخصا آلودگی کشت های سلولی با مایکوپلاسما موجب اثرات و تغییراتی در رشد سلولی، مورفولوژی، متابولیسم آمینواسیدها و اسیدهای نوکلئیک، ویژگی های ایمونولوژیک و بیوشیمیایی،نقص کروموزومی و در نتیجه بدست آوردن نتایج غیر قابل اعتماد می گردد(۵و۲و۱).

منشاء اصلی آلودگی کشت های پاک، کشت های عفونی شده با مایکوپلاسما است(۳). منبع آلودگی ها (برای مثال منابع مستقیم) اغلب پرسنل آزمایشگاه (*مایکوپلاسما اورال* و *مایکوپلاسما سالیواریوم* از اوروفارنکس ۸۰-۲۵ درصد افراد سالم جدا می شود؛ *مایکوپلاسما فرمنتانس* هم به ندرت جدا می گردد) ، و سرم های حیوانی تجارتی مورد استفاده در محیط های کشت سلولی(*مایکوپلاسما آرجینینی*، *اکولپلاسما لیدلاوی*، *مایکوپلاسما هیورینیس*) است(۶و۴).

مایکوپلاسماها باکتری هایی پلئومورف، با قطری حدود ۵۰۰-۲۰۰ نانومتر، و فاقد دیواره سلولی هستند. بنابراین ، به سهولت از منافذ فیلترهای ۴۵۰ و ۲۲۰ نانومتر که برای کشت سلول استفاده می شود، عبور کرده و از این طریق باعث آلودگی می گردند. وقتی از فیلتراسیون با فشار بالا استفاده شود برخی مایکوپلاسماها از فیلترهای با تخلخل ۱۰۰ نانومتر هم عبور کرده و آلودگی ایجاد می نمایند(۷). سرم های آلوده به ندرت از طریق بازدید بصری یا میکروسکپی، در غیاب علائم و آثار روشن عفونت (برای مثال تیرگی سرم یا محیط، تغییرات *PH* ، یا اثرات سیتوپاتیک روی دودمان های سلولی) قابل تشخیص هستند. به علاوه، سرم شرایط مساعدی برای رشد مایکوپلاسما را به دلیل فقدان سلول های زنده و کمبود عناصر رشد و همچنین داشتن اجزاء سمی و ممانعت کننده رشد، ندارد. آلودگی کم و کاهش میزان آلودگی ها به وسیله فیلتراسیون، موجب عدم تشخیص مایکوپلاسما در سرم های تجارتی می گردد.

روش های تشخیص مایکوپلاسماها را می توان به دو دسته ۱) روشهای بر پایه کشت، و ۲) روشهای غیر کشتی، که از جهت سرعت، قابلیت اعتماد، ویژگی و حساسیت تفاوت هایی چند با هم دارند تقسیم بندی نمود(۹و۸و۴و۲و۱). روش های برپایه کشت، وقت گیر(چندین هفته) با حساسیت نسبتا پایین و نیازمند امکانات و همینطور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج است. برخی از مایکوپلاسماها هم مانند مایکوپلاسما هیورینیس (*M. hyorhinis*) به سختی در محیط کشت رشد می کنند(۸). روش های غیر کشتی شامل ۱) غربالگری آدنوزین فسفوریلاز (*Adop*) ،۲) تکنیک نشانگر کشت سلول، ۳) رنگ آمیزی *DNA* با رنگ های فلوروکروم، ۴)دو رگه سازی اسید نوکلئیک و ۵) واکنش زنجیره ای پلیمراز یا *PCR* می باشد (۱۱و۱۰و۲و۱). روش های بیوشیمیایی مانند آدنوزین فسفوریلاز فاقد و یژگی اند. زیرا برخی باکتری ها مانند باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، نوکلئوزید فسفوریلاز را تولید کرده و در ضمن برخی گونه های مایکوپلاسما، مانند مایکوپلاسما پنومونیه *FH* ، مایکوپلاسما پیروم، مایکوپلاسما لیپوفیلوم در عمل چیزی تولید نمی کنند(۱۲). روش های بر پایه تلقیح به کشت های سلولی فاقد مایکوپلاسما و حاوی اندیکاتور هم، به دلیل سه پاساژ و تکنیک نهایی تشخیصی (برای مثال رنگ آمیزی *DNA* با رنگهای فلوئورسنت مانند ′ ۴ ، ۶-دی آمیدینو-۲-فنیل ایندول دی هیدروکلراید یا بیس بنز ایمیدازول فلوروکروم هوخست ۳۳۲۵۸ ، یا سنجش های بر پایه الایزا با آنتی بادی های ویژه) وقت گیر می باشد(۱۳). روش های بر پایه رنگ آمیزی و دو رگه سازی هم دارای حساسیت کم ونوعا ویژگی پایین هستند. بنابراین اکثریت روش های در دسترس شناسایی آلودگی های مایکوپلاسمایی، جهت شناسایی همزمان اکثریت وسیع گونه های مایکوپلاسمایی آلوده کننده مناسب نیستند(۱۴). جهت غلبه بر این مشکلات، روش های تکثیر اسید نوکلئیک مانند *PCR* ، در دهه اخیر توسعه فراوانی یافته است(۱۶و۱۵)و روش های مناسبی جهت تشخیص طیف وسیعی از عوامل آلوده کننده، خصوصا مایکوپلاسماها هستند(۱۷و۱۱و۱۰و۲و۱). ثابت شده که روش های

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بر پایه تکثیر، برای شناسایی برخی قطعات خاص *DNA* ژنوم مایکوپلاسما دارای سرعت و ویژگی است(۲۰-۱۸) ، معذالک، میزان حساسیت این تکنیک تا حد زیادی به ۱) روش استخراج *DNA* ، ۲) ژن هدف، ۳) پرایمرهای طراحی شده، ۴) روش شناسایی محصول، ۵) نوع نمونه و بسیاری فاکتورهای دیگر بستگی دارد. پرایمرهای طراحی شده عموما جهت بخش های مشترک ژن *S rRNA* ۱۶ ، یا بخش های *S -۲۳S rRNA* ۱۶ (۲۴-۲۰) ، و یا هدف های دیگر طراحی شده است. سکانس ژن های *rRNA* در تعداد زیادی از گونه های مایکوپلاسما، تعیین ترادف شده است.

مطالعات فیلوژنتیک سیستماتیک این ارگانیسم ها و همینطور بررسی های کامپیوتری مقایسه ای این ترادف های ریبوزومی، موید بخش های بشدت ثابت و مشترک در همه انواع مایکوپلاسمایی است که جهت طراحی پرایمرهای *PCR* مناسب بکار می روند.

در این مطالعه سعی شده است جهت پی بردن به آلودگی های مایکوپلاسمایی در نمونه های مختلف روشی مولکولی با حساسیت بالا طراحی کنیم. در واقع یک روش بر پایه *PCR* جهت آشکار کردن مایکوپلاسماها در نمونه های کشت سلولی و سایر فرآورده های بیولوژیک مانند واکسن ها توسعه داده شود.

مواد و روش ها:

سویه های باکتریایی: گونه های بکار رفته عبارت بودند از: *مایکوپلاسما پنومونیه*(NCTC 10119) ، *مایکوپلاسما آرجینینی*، *مایکوپلاسما هیورینیس* ،*مایکوپلاسما اورال* ،*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 *اکول پلاسما لیدلاوی* . به علاوه ، میکروارگانیسم های *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) ، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (*S. epidermidis*) ، *استرپتوکوکوس پیوژنز* (*Streptococcus pyogenese*) ، *استرپتوکوکوس پنومونیه*(S. pneumoniae) ، *باسیلوس سوبتیلیس*(*B. subtilis*)، و *باسیلوس میکوئیدس* (*B. mycoides*)، *گونه های کورینه باکتریوم*، *گونه های کلاستریدیوم* ، *انتروکوکوس فکالیس*(*Enterococcus faecalis*) ، *اشریشیا کلی*(Escherichia coli) ، *گونه های سالمونلا* ، *گونه های شیگلا*، *گونه های پروتئوس*، *هلیکوباکتر پیلوری* (*Helicobacter pylori*) ، *ساکارومیسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) ، *گونه های آسپرژیلوس* ، *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) ، وهمینطور سلول های انسانی و موشی از جهت آزمون ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در *PCR* ، مورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفتند.

کشت های سلولی: کشت های سلولی از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران/ایران بدست آمد. تعداد ٤٧ رده سلولی انسانی و حیوانی از جهت آلودگی و به طریق مولکولی مورد بررسی واقع شد.

استخراج *DNA* : *DNA* ژنومیک گونه های مایکوپلاسمایی از طریق کیت استخراج *DNA* به نام *DNG-Plus* (سیناژن) استخراج گردید. از سلول های انسانی و موشی هم به طریق فوق *DNA* استخراج شد.

DNA ژنومیک باکتری های غیر مایکوپلاسمایی از طریق جوشاندن همراه با دترجنت غیر یونی ترایتون ایکس ۱۰۰ (یک هزارم) ، بدست آمد. *DNA* یک کلنی از باکتری فوق بدین روش استخراج گردید و در مراحل بعدی به عنوان الگو استفاده شد. از نمونه های کشت سلول و سایر نمونه های مورد آزمایش هم به طریق فوق، *DNA* استخراج گردید.

۱۰میکرولیتر از *DNA* بدست آمده با روش *DNG* ، با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر راهنما در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. هم چنین با استفاده از اسپکترفتومتر میزان جذب در طول موج ۲٦۰ نانومتر و نسبت ۲٦۰به۲۸۰ آن نیز (خلوص آن ۱/۸ - ۱/٦) بدست آمد.

پرایمر و شرایط *PCR* : پرایمرهای مورد استفاده ، پرایمرهای مخصوص جنس *GPO-3* و *MGSO* (۲٦و۲۵و۲۱)بود که پرایمر جلویی یعنی *GPO-3* آن در این مطالعه از طریق افزودن دو نوکلئوتید *GT* در ' ۵ آن تغییر پیدا کرد. بنابراین ترادف پرایمرهای مورد استفاده عبارتند از: پرایمر جلویی

*Shah-*۵'*-GTGGGAGCAAAYAGGATTAGATACCCT*-۳'

GPO-3- و پرایمر عقبی

۵' *TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC*-۳'

MGSO- . ۵ میکرولیتر از *DNA* ژنومیک حاصل درمیکس ۲۵ میکرولیتری *PCR* ، با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص نواحی مشترک یا همسان *S rRNA* ۱٦، با غلظت نهایی ۰/٤ میکرومول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر *PCR (10X)* (سیناژن) ، ۱/۵ میلی مولار$MgCl_2$ (از غلظت ۵۰*mM* (سیناژن))، ۰/۲ میلی مولار مخلوط *dNTP (10mM)* (سیناژن) وبا استفاده از ۲ واحد آنزیم*Taq*

(5µ/1uL) ، (Taq DNA Polymerase سیناژن) و چرخه های حرارتی ۹٤ درجه سانتی گراد دودقیقه یک سیکل، ۹٤ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه وطی ٤۰ سیکل PCR و پلیمریزاسیون نهایی ۷ دقیقه، تکثیر یافتند. محصول PCR با سایز مورد نظر ۲۷۲ جفت باز، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، برروی ژل آگاروز ۲ درصد وبا استفاده از اتیدیوم بروماید و نور UV بررسی گردید

ساخت کنترل مثبت از طریق PCR-CLONING : عمل کلون کردن قطعه ۲۷۲ جفت بازی با استفاده از کیت T/A Cloning کمپانی فرمنتانس (K1214) و در وکتور pTZ57R این کیت، انجام گرفت. به طور خلاصه در ابتدا محصول PCR مورد نظر را روی ژل برده و پس از اطمینان از خالص بودن آن مستقیما" برای عمل کلونینگ استفاده شد. سپس با استفاده از محیط C-medium این کیت، سلول های مستعد سویه DH5-alfa باکتری اشریشیا کلی آماده شد. سپس عمل Ligation با استفاده از کیت مذکور انجام گرفت. مخلوط لایگیشن به مدت چهار ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی گراد) انکوبه گردید. بعد طی پروتکل کیت، مرحله ترانسفورماسیون انجام گردید. کلنی های سفید بر روی پلیت حاوی آمپی سیلین (50 µg/ml) به علاوه مادهٔ X-Gal و IPTG انتخاب شدند. کلنی های سفید حاوی ژن مورد نظر می باشند. سپس به صورت تصادفی ۱۰ عدد از کلنی‌های سفید انتخاب گردیده و کشت خطی بر روی پلیت LB agar واجد آمپی‌سیلین داده شد و مجدداً در ۳۷°C به یک شب انکوبه گردید. پس از این مدت یک یا دو کلنی به لوله های ۱/۵cc حاوی ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کرده و یک قطره روغن معدنی استریل به آن افزوده و به شدت ورتکس گردید. سپس در لوله ها با پارافیلم بسته شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند، تا غشاء باکتری ها پاره و پلاسمید خارج گردد. لوله ها به مدت یک دقیقه در میکروسانتریفوژ با سرعت ۱۲۰۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس از مایع رویی برای PCR استفاده شد. PCR با مواد و مقادیر ذکر شده قبلی انجام داده شد، ومحصول بر روی ژل آگارز۲٪ مشاهده گردید. تمامی کلنی‌ها واجد قطعه مورد نظر بودند. لذا دو عدد از آن ها به نام pSHA272-1 و pSHA272-2 به صورت تصادفی انتخاب و با استفاده از روش لیز قلیایی از آنها پلاسمید استخراج و در مرحلهٔ بعد PCR را با پلاسمیدهای استخراج شده انجام داده و محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی گردید. از پلاسمیدهای حاصل به عنوان کنترل مثبت و همینطور جهت تعیین توالی استفاده شد.

حساسیت و ویژگی: جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده، از دو روش استفاده شد. ۱) تهیه رقت از سوسپانسیون مایکوپلاسما پنومونیه با واحد کلنی ساز (CFU) مشخص، استخراج DNA از رقت ها و انجام آزمون PCR ؛ ۲) رقیق سازی پلاسمید pSHA-272-1 و انجام PCR بر روی محلول های حاوی مقادیر مشخص از پلاسمید.

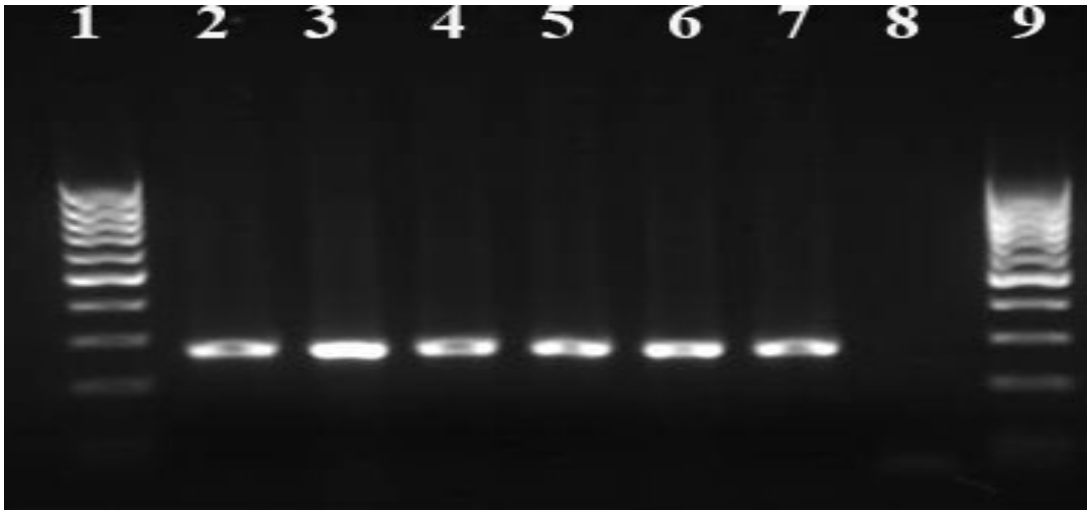
آزمون ویژگی با استفاده از تعداد زیادی از میکروارگانیسم ها، غیر از مایکوپلاسماها که در سویه های باکتریایی نام آنها ذکر شد و همینطور DNA سلول های یوکاریوت پست، رت و انسان انجام شد.

توالی یابی(Sequencing) : توالی DNA در جهت جلویی با استفاده از امکانات سکانس اتوماتیک ترمیناتور رنگی به روش ختم زنجیره Dideoxy-Chain Termination انجام و محصول تائید گردید.

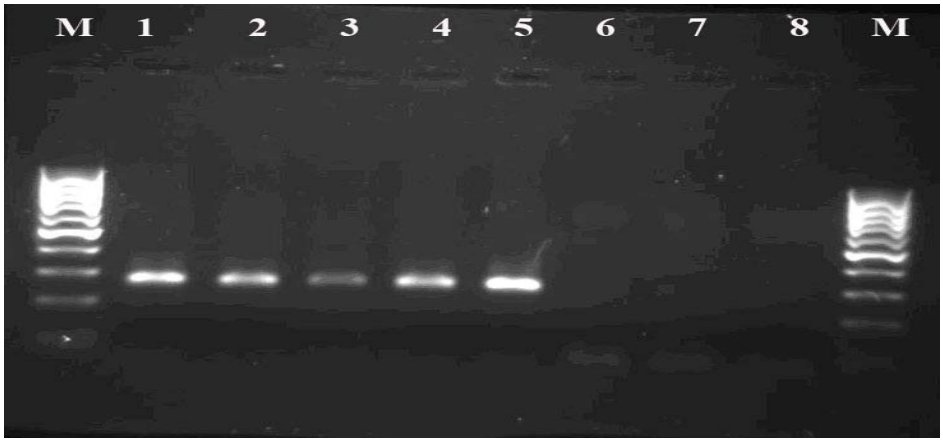
یافته ها:

برای طراحی روش مولکولی با حساسیت بالا با تغییر دادن پرایمرهای GPO-3 و اضافه کردن دو باز در ابتدای آن، و نزدیک کردن دمای چسبیدن پرایمر SHAH-GPO-3 به MGSO ، حساسیت و در عین حال ویژگی آن را افزایش دادیم. همینطور با افزایش دمای چسبیدن پرایمرها به سکانس های مکمل(حدود C ۷۰°)، شرایط سختی را نیز بالا بردیم. سکانس S rRNA ۱۶ انواع و اقسام گونه های مایکوپلاسمایی را ازGeneBank به دست آورده و پرایمرهای تغییر یافته را بر اساس این ترادف ها و شماره های دسترسی (Accession number) ، بررسی نمودیم. بنابراین با تغییر پرایمر GPO-3 و طراحی SHAH-GPO-3 و با استفاده از DNA سویه های مولیکوت ، که در سویه های باکتریایی نام برده شد ، تکنیک PCR را بهینه نمودیم. با تمام مایکوپلاسماهای مورد آزمایش، جفت پرایمر مورد استفاده منتج به محصول ۲۷۲ جفت بازی گردید(شکل ۱).

مایکوپلاسما در ۴۷ رده سلولی مورد آزمایش به وسیله PCR مخصوص جنس بهینه شده جستجو شد. از این تعداد، ۲۵ رده سلولی آلوده (۵۳٪)، از طریق تکثیر قطعه صحیح، تشخیص داده شد(شکل ۲).

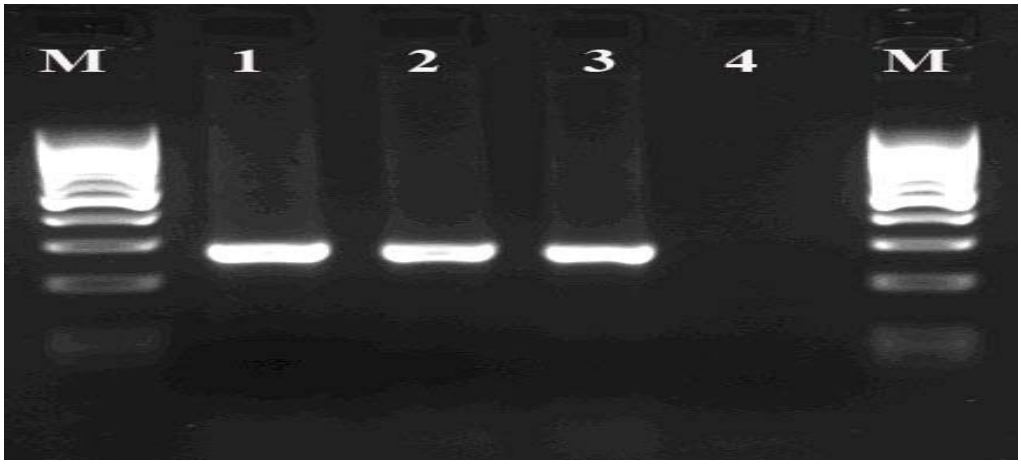


شکل۱: ژل آگاروز الکتروفورز نتایج تکثیر ***PCR*** با استفاده از پرایمرهای ***SHAH-GPO-3*** و ***MGSO*** : ستون ۱و۹، سایز مارکر ***bp DNA Ladder*** ۱۰۰ (فرمنتاس) ؛ ستون۲، *مایکوپلاسما آرجینینی*؛ ستون۳، *مایکوپلاسما هیورینیس*؛ ستون۴، *مایکوپلاسما اورال* ؛ ستون۵ ، *مایکوپلاسما فرمنتاس*؛ ستون۶ ، *اکولپلاسما لیدلاوی*؛ ستون ۷ ،*مایکوپلاسما پنومونیه*؛ ستون ۸ ، کنترل منفی(آگاروز ۲٪ و بافر ***TBE 0.5X***).



شکل۲: نتایج الکتروفورز تکثیر ***PCR*** تعدادی از رده های سلولی مورد آزمایش: ستون***M*** ، سایز مارکر ***bp DNA Ladder*** ۱۰۰ (فرمنتاس)؛ ستون۱، کنترل مثبت؛ ستون۲ الی ۵ ،چهار رده سلولی آلوده ؛ ستون ۶ و ۷ ،دو رده سلولی غیر آلوده؛ ستون ۸؛ کنترل منفی(آگاروز ۲٪ و بافر ***TBE 0.5X***).

جهت بررسی و تائید ویژگی سنجش *PCR* مخصوص گروه مایکوپلاسما، قطعه ۲۷۲ جفت بازی در پلاسمید *pTZ57R* و باکتری *اشریشیا کلی* *DH5-alfa* کلون و پلاسمیدهای *pSHA272-1* و*pSHA272-2* ساخته شد (شکل ۳). از این پلاسمید حاوی اینسرت، به عنوان کنترل مثبت و همینطور جهت تعیین ترادف استفاده گردید. ترادف حاصل با سکانس های موجود از طریق برنامه *BLAST* ،مطابقت و *Identity* حدود صد در صد به دست آمد. بنابراین نتایج تعیین ترادف ما با سکانس های موجود در بانک ژنی مطابقت داشت.



شکل ۳: نتایج *PCR* قطعه ۲۷۲ جفت بازی کلون شده و ساخت پلاسمیدهای *pSHAH272-1* و *pSHAH272-2* .

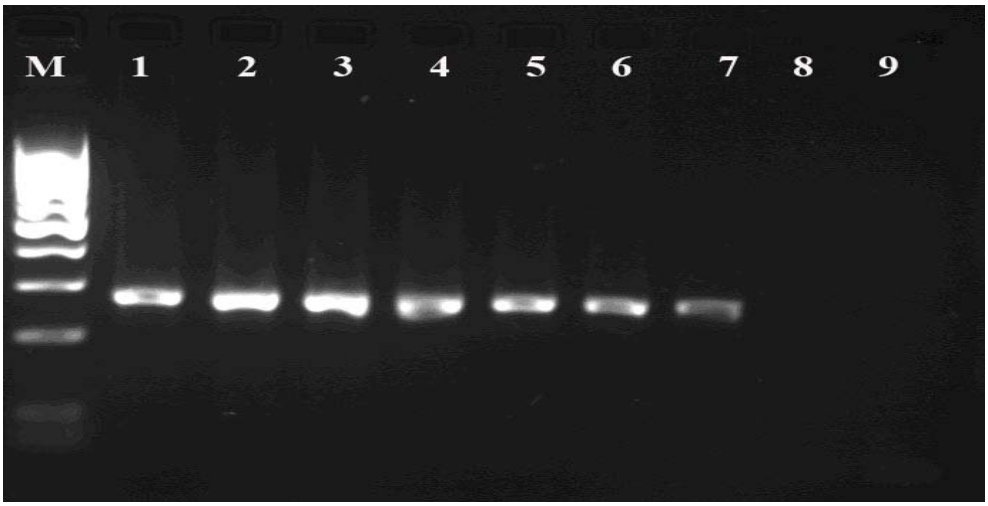
ستون*M* ، سایز مارکر *bp DNA Ladder* ۱۰۰ (فرمنتاس)؛ ستون۱، کنترل مثبت؛ستون۲ و ۳، پلاسمیدهای به ترتیب *pSHAH272-1* و *pSHAH272-2* ؛ ستون ۴ ، کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر *TBE 0.5X*).

در این مطالعه سعی شد از روش استخراج *DNA* ساده و سریع استفاده شود لذا از روش جوشاندن به همراه یک دترجنت غیر یونی مانند *Triton X 100* ، که حضورش در مقادیر نسبتا بالاتری از دترجنت های یونی مانند *SDS* ، در مرحله تکثیر قابل تحمل است، استفاده گردید. بنابراین مرحله استخراج *DNA* این بررسی ،روشی سریع و نسبتا حساس است.

جهت ارزیابی حساسیت آزمون، از پلاسمید حاوی اینسرت با تعداد مشخص استفاده شد و بدین ترتیب از طریق رقت سازی پلاسمید حاوی اینسرت، حساسیت تست در حد ۱۰ کپی در نمونه مورد آزمایش به دست آمد. حساسیت از طریق رقیق سازی کشت مایکوپلاسما پنومونیه با واحد سازنده کلنی مشخص هم انجام شد و نتایج مشابهی(در حد پیکوگرم از *DNA* مایکوپلاسما پنومونیه) حاصل شد (شکل ۴).

در آزمون ویژگی پرایمرهای *SHAH-GPO3* و *MGSO* ، هیچ محصول خواسته ای(*bp* ۲۷۲) با *DNA* باکتری های غیر مایکوپلاسمایی مورد آزمایش و همینطور *DNA* انسان و موش و یوکاریوت های پست ، دیده نشد . در دمای چسبیدن $70\ ^{o}C$ ، جفت پرایمر مورد بررسی یک باند اختصاصی ۲۷۲ جفت باز با همه گونه های مایکوپلاسمایی مورد آزمایش و همینطور با همه گونه های مولیکوتس ایجاد نمود. به علاوه ، وقتی که این جفت پرایمر با طیف وسیعی از میکروارگانیسم های نام برده شده در قسمت روش ها و با *DNA* رت و انسان انجام شد، هیچ محصول تکثیری ایجاد ننمود.

فقط یک بخش ، یعنی نوکلئوتیدهای ما بین ۱۰۲۹ تا ۱۰۵۵ سکانس *S rRNA* ۱۶ مایکوپلاسماها پتانسیل و معیارهای مناسب جهت پرایمر مخصوص جنس را دارد. مطابقت این بخش با سکانس *rRNA* چندین میکروارگانیسم ، کلروپلاست ها و همینطور یوکاریوت ها موید تعداد زیادی اتصال ناجور در قسمت ' ۵ این بخش (که مطابق انتهای ' ۳ پرایمر *MGSO* است) می باشد. اطلاعات به دست آمده تطبیق این بخش با چندین میکروارگانیسم، شامل اعضای جنس های خویشاوند و منسوب با مایکوپلاسماها، یعنی استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، باسیلوس، کلاستریدیوم و اریزیپلوتریکس تائید کننده این موضوع است که اختلافات زیادی ما بین آنها وجود دارد. همینطور تطبیق این بخش با گونه های متعدد موجود در مولیکوت، موید هومولوژی و اختلافات کم ، در حد یک یا دو نوکلئوتید ، و آن هم به طور غیر



شکل ۴ : آزمون حساسیت *PCR* بهینه شده با استفاده از نمونه های مشخص کلنی کانت شده (*CFU* مشخص).

ستون*M* ، سایز مارکر *bp DNA Ladder* ۱۰۰ (فرمنتاس)؛ ستون۱، کنترل مثبت؛ ستون۲ الی ۸حاوی نمونه های مشخص و به ترتیب ستون ۲ (*CFU* ۳۱۲۵۰) ، ستون ۳ (*CFU* ۶۲۵۰) ، ستون ۴ (*CFU* ۱۲۵۰) ، ستون ۵ (*CFU* ۲۵۰)، ستون ۶ (*CFU* ۵۰) ، ستون ۷ (*CFU* ۱۰)، ستون ۸(*CFU* ۲)، ستون ۹، کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر *TBE 0.5X*).

متمرکز و دور از ناحیه ' ۳ پرایمر طراحی شده می باشد. بنابراین اعضاء جنس مولیکوت به وسیله کاربرد این پرایمر، تکثیر می گردند. در ضمن این تطبیق ها نشان دهنده آن است که پرایمر به کار رفته برای جنس مایکوپلاسما، منحصر نمی باشد و اعضاء جنس اوره آپلاسما، اسپیروپلاسما و اکول پلاسما نیز در استفاده از این پرایمرهای بخش *S rRNA* ۱۶ ، تکثیر می یابند. به دلیل اینکه فقط یک بخش مخصوص مایکوپلاسما تعیین هویت شد لذا الیگونوکلئوتید *Shah-GPO3* به عنوان پرایمر ' ۵ ، در جفت پرایمر مخصوص جنس مورد استفاده واقع شد.

بحث:

عفونت مایکوپلاسمایی کشت های سلولی موجب تغییرات بیوشیمیایی و ژنتیکی و نتیجتا تفسیر نامتناسب نتایج آزمایش بر روی کشت های سلولی آلوده می گردد. بنابراین، جستجوی آلودگی مایکوپلاسمایی به طور دوره ای در آزمایشگاه هایی که با کشت سلول سروکار دارند بایستی انجام شود(۲۸و ۲۷).

تلفیق نتایج سرولوژیک و بیوشیمیایی اغلب وسیله ای مفید جهت تعیین هویت مولیکوتها می باشد. معذالک، داده های بیوشیمیایی حاصل اغلب فاقد قدرت شناسایی بوده و همینطور مسئله واکنش متقاطع سرولوژیکی و حساسیت کم، همیشه یکی از سدهای مهم کاربرد روشهای سرولوژیک می باشد(۳۱-۲۹). در این مطالعه سعی شده است با استفاده از روشی مولکولی و حساس، بازده تعیین هویت مایکوپلاسماهای آلوده کننده کشت های سلولی و فرآورده های بیولوژیک افزایش یابد. نتایج به دست آمده در این مطالعه، دلالت بر این موضوع دارد که می توان از سکانس های ثابت و مشترک *S rRNA* ۱۶ موجود در مایکوپلاسماها، به عنوان یک هدف مناسب جهت تشخیص گونه های متعدد و آلوده کننده سرم های حیوانی، کشت های سلولی و فرآورده های بیولوژیک، استفاده نمود.

به طور ایده آل، این روش بایستی نه تنها قادر به شناسایی ۵ گونه تیپیک آلوده کننده(مایکوپلاسما هیورینیس، آرجینینی، اورال، فرمنتانس و اکولپلاسما لیدلاوی) و عامل بیش از ۹۸٪ آلودگی ها باشد(۳۰، ۳، ۲) بلکه بایستی سایر گونه های آلوده کننده مولیکوت ها و متعلق به جنس های مایکوپلاسما، اکولپلاسما، اوره آپلاسما و اسپیروپلاسما (که عامل باقیمانده ۲٪ آلودگی است) راهم شناسایی نماید. در این مطالعه سعی شده است یک سنجش *PCR* بر پایه پرایمرهای مخصوص گروه مایکوپلاسما و هدف ژنی *S rRNA* ۱۶ که مقاصد بالا را مهیا کند توسعه داده شود. بر این مبنا با انتخاب سکانس های *S rRNA*۱۶ تعداد زیادی مایکوپلاسما و صف بندی و تجزیه و تحلیل کامپیوتری با سکانس های دیگر پروکاریوت ها،

پرایمرهای *Shah-GPO-3* و *MGSO* انتخاب شدند. تکثیر *in-vitro* به وسیله *PCR* و با استفاده از این جفت پرایمر، منتج به تکثیر سکانس اعضاء مولیکوت ذکر شده در بالا، و عدم تکثیر هیچ نوع محصول با سایر پروکاریوت ها گردید و البته در این بررسی، مناسب بودن این پرایمرها و سنجش جهت تشخیص آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت سلول ثابت گردید. در عین حال نتایج سنجش *PCR* حاضر به وسیله تکنیک تعیین ترادف تائید گردید.

مقایسه ما بین تکنیک *PCR* با کشت میکروبی، روش های رنگ آمیزی *DNA* با رنگ های فلوروکروم، و تکنیک هیبریدیزاسیون موید این موضوع است که *PCR* روشی حساس، سریع و کارآمد است. روش های کشت میکروبی مستلزم یک تا ۴ هفته وقت در آزمایشگاه می باشد. به علاوه، می دانیم که هنوز برخی از سویه های مایکوپلاسما علی رغم پیشرفت های زیاد در کشت میکروبی غیر قابل رشد و یا به سختی زیاد (مانند *M. hyorhinis*) رشد می نمایند(۳۲). در مطالعات مشابه که از تکنیک کشت به همراه روش های دیگر مثل روش *PCR* استفاده شده نشان داده شده است که تکنیک کشت دارای نتایج منفی کاذب زیادی می باشد (۲۱و۸و۶و۳). در مورد کشت ها، تفسیر نتایج هیبریدیزاسیون و رنگ آمیزی *DNA* به دلیل آلودگی باکتریایی غیر ممکن است.

مهم ترین عیب تکنیک رنگ آمیزی *DNA* با رنگ های فلوروکروم، مشکل تفسیر نتایج است. این اشکال ناشی از حضور باکتری های آلوده کننده یا اسید نوکلئیک تجزیه شده که باعث ایجاد سیگنال فلوئورسانس خارج هسته ای شده و بدین ترتیب حضور مایکوپلاسما پنهان می گردد ناشی می شود(۳۲).

تکنیک هیبریدیزاسیون(دورگه سازی) بر پایه همان اصول *PCR* بنا نهاده شده است. اگر چه هر دو روش به طور نسبی سریع هستند اما فرق هایی هم دارند. به طور مثال، گاهی تفسیر نتایج هیبریداسیون به دلایلی مشکل می شود. بدین معنی که نوعا تفریق بین سیگنال های مخصوص و سیگنال های غیر ویژه، به دلیل حضور واکنش متقاطع ما بین باکتری های گرم مثبت مشکل می گردد(۳۳). بنابراین، نتایج مثبت هیبریدیزاسیون، فقط زمانی مورد استناد است که کشت میکروبی هیچ باکتری گرم مثبت دیگری را نشان ندهد. مزیت دیگر *PCR* حساسیت بالاتر آن نسبت به تکنیک های دو رگه سازی است. حساسیت روش هیبریدیزاسیون *rRNA* با *DNA* که حدود $۱۰^{۳}$ تا $۱۰^{۴}$ ارگانیسم است در مواردی مانع از تشخیص مایکوپلاسما در نمونه های آلوده می گردد. بنابراین موارد فوق مبین برتری های تکنیک *PCR* نسبت به روش های کلاسیک، خصوصا در مواردی است که تعداد عامل در نمونه کم است(مانند درست قبل از تهاجم عفونت، بعد از روش های زدودن مایکوپلاسما، یا در حضور سرم با تعداد کم عامل).

علی رغم مراقبت های زیاد و فضاسازی مناسب جهت تکنیک های تکثیری همچون PCR ، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که در نتیجه باعث مثبت های کاذب می گردد. البته تجربه نشان داده است که با اختصاص فضاها و تجهیزات مناسب در مناطق (زونهای) پیش بینی شده، این امکان به صفر نزدیک می گردد. لذا کاربست کنترل های مناسب(کنترل مثبت، منفی و یا نوعا کنترل درونی) در مراحل مختلف استخراج *DNA* ، تکثیر و مرحله تشخیص، کمک شایانی به کاهش آلودگی و نشاندادن آن می نماید.

نتایج *PCR* منفی عمدتا به دو دلیل: ۱) تعداد کم مایکوپلاسما در نمونه و ۲) عدم توزیع مایکوپلاسما (بدین معنی که به بخشی از سلول های کشت، مایکوپلاسما چسبیده و بنابراین وقتی که برای اولین بار نمونه تقسیم می شود حضور مایکوپلاسما در برخی لوله ها بیشتر است) به وجود می آید.

یکی از راه ها جهت افزایش حساسیت *PCR* ، کاربرد روش تغییر یافته ای از آن به نام *Nested-PCR* است. *Spaepen* (۳۴) با استفاده از دوجفت پرایمر جهت هدف ژنی *S rRNA* ۱۶، آلودگی های مایکوپلاسمایی را با حساسیت بالایی شناسایی نمود. اما دور دوم *PCR* در این روش ریسک آلودگی سیستم با *DNA* و ایجاد مثبت های کاذب را افزایش می دهد. حساسیت و قابلیت اعتماد دو شرط لازم یک تکنیک تشخیص میکروبی بر مبنای *PCR* می باشد. مطالعات قبلی نشان داده است که شناسایی جنس مایکوپلاسما از طریق *PCR* در مقایسه با روش های کلاسیک برتری هایی دارد. اما این موضوع از جهت حساسیت و ویژگی هنوز قابل بحث است. بهینه نمودن سکانس پرایمر و شرایط واکنش در این بررسی موجب تشدید حساسیت، ویژگی و همینطور قابلیت تکرار و اعتماد بیشتر شده است. مشخصا ویژگی ارائه شده روش اخیر جهت تفریق مابین آلودگی مایکوپلاسمایی از دیگر عوامل آلوده کننده احتمالی شامل اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و مخمرهای جوانه زن بیشتر است.

هدف اولیه در این بررسی ارائه یک روش قابل اعتماد برای شناسایی مایکوپلاسماها در کشت سلول، سرم های حیوانی، فرآورده های بیولوژیک و بر مبنای کاربرد تکنولوژی *PCR* بود. به همین منظور بخش های ثابت و مشترک ژن *rRNA* را به عنوان

نتیجه گیری:

نتایج نشان دادند که سنجش *PCR* بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک موجود در *۱۶S rRNA*، یک تکنیک مفید، ارزشمند و قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی،و دقت بالا جهت شناسایی آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت سلول و سایر فرآورده های بیولوژیک است. البته تحقیقات بیشتری بایستی در زمینه استخراج *DNA* ، روش های تغلیظ نمونه، سکانس های هدف، روش شناسایی محصول تکثیری انجام گردد.

تقدیر و تشکر:

از آقای دکتر محسن لطفی و خانم سهیلا مرادی از موسسه رازی بخش مدیریت کنترل کیفی و میکروب شناسی برای در اختیار گذاشتن سوش های مایکوپلاسما، آقای وحید ملاکاظمی و آقای شهرام آذری از بخش کشت سلول انستیتو پاستور ایران به دلیل در اختیار گذاشتن کشت های سلولی و راهنمایی های علمی صمیمانه سپاس گزاری می شود.

هدف تکثیری، به دلیل فراوانی سکانس های آن و همینطور ثابت و مشترک بودن آنها در بین اعضاء مولیکوت ها در طول تکامل، انتخاب نمودیم. به طور معمول، آنالیز *PCR* آلودگی های مایکوپلاسمایی نیازمند پرایمرهایی است که اجازه شناسایی مولیکوت ها و تفریق آنها از سایر آلودگی های غیر مایکوپلاسمایی را بدهد. به علاوه، این رویه بایستی فارغ از واکنش متقاطع با *DNA* دودمان های سلولی باشد. تکنیک ارائه شده حاضر که به صورت یک پروتکل تک مرحله ای است قادر به شناسایی حداقل ۱۰ کپی از مولکول *DNA* هدف در نمونه های بیولوژیک بوده و شواهد موید عدم واکنش متقاطع با *DNA* ژنومیک دیگر ارگانیسم ها شامل انسان، موش، ساکارومیسس سرویزیه، و اشریشیا کلی است. پروتکل های دیگر ارائه شده توسط محققین دارای حد شناسایی بین ۱ الی ۱۰۰ مایکوپلاسما، بسته به ۱)گونه مایکوپلاسمای آزمایش شده، ۲)هدف ژنی *PCR* ، ۳)نوع و طراحی پرایمر ، و ۴) شرایط *PCR* ، بیان شده است(۳۸-۳۵).

فهرست مراجع:

1. Wang H, Kang F, Jelfs P, James G, and Gilbert GL. Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mullicutes strain by reverse line blot hybridization. *Appli Environ Microbiol* 2004; **70**(3): 1483-1486.
2. Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-based detection of Mycoplasma species. *J Microbiol* 2006; **44**(1): 42-49.
3. McGarrity GJ, Kotani H, Butler GH. Mycoplasmas and tissue culture cells, in: Manillof J, Mcelhaney N, Finch LR, Baseman JB (ed)., Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis. *American Society for Microbiology*, Washington, D. C.; 1992: 445-454.
4. Dussurget O, Dussiox DR. Rapid and, sensitive PCR-based detection of Mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Appli Environ Microbiol*; 1994; **60**(3): 953-959.
5. Stakenborg T, Vicca J, Verhelst R, Butaya P, Maes D, Naessens A, Claeys G, Ganck CD, Haesebrouck F, Vaneechoutte M. Evaluation of tRNA gene PCR for identification of Mollicutes. *J Clin Microbiol* ;2005; **43**(9): 4558-4566.
6. Barile MF. Mycoplasma-tissue cell culture interactions. In: Tully GJ, Whitcomb RF (ed), the Mycoplasmas, vol.2. Academic Press, New York; 1979: 425-474.
7. Hay RJ, Macy ML, Chen TR. Mycoplasma infection of cultures cells. *Nature(London)* 1989; 487-488.
8. Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, Macleod R, Quentmeier H, Steube, etal. Sensitivity and specificity of five different Mycoplsma detection assays. *Leukamia* 1992. 335-341.
9. loens K, Uris D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4915-4923.
10. 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. *Biological* 2004; **32**(4): 183-193.
11. 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.
12. Bonissol C, traincard F, Stoiljkovic B, Hosli P. Adenosine phosphorylase activity as a

13. jurmanova K, hajkova M, Fischer O. Detection of Mycoplasmas in cell cultures. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr* 1990; **20**: 947-948.
14. 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.
15. Shahhosseiny MH, Polymerase chain reaction. 1th eds, Tehran, Islamic Azad University Press; 1384: 1-25.
16. Shahhosseiny MH, Basic molecular diagnosis. 1th eds, Tehran, Islamic Azad University Press; 1384: 1-30.
17. Hart MK, Delgiudice RA, Korch GW. Absence of Mycoplasma contamination in the anthrax vaccine. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**(1): 94-96.
18. Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K, Waters C, Douglass P, Stallock J, etal. The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, *mycoplasma pneumoniae, Chlamydia(chlamydophila) pneumoniae, legionella pneumophila, legionella micdadei,* and *Bordetella pertussis*, and its real-time counterpart. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 565-571.
19. 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
20. Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K, Kato I. Detection and tentative identification of dominant Mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Res Microbiol* 1993; **144**: 489-493.
21. Van-kuppeveld FJ, Van-der-logt JT, Angulo AF, Van-Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, etal. Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992; **58**: 2606-2615.
22. Rawadi G, Dussurget O. Advances in PCR-based detection of Mycoplasmas contaminating cell cultures. *PCR methods Appl* 1995; **4**: 199-208.
23. Quirk JT, Kupinski JM, Dicioccio RA. Detection of Mycoplasma ribosomal DNA sequences in ovarian tumors by nested PCR. *Gynecol Oncol* 2001; **83**: 560-562.
24. Tang J, Hu M, Lee S, Robin R. A polymerse chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture. *J Microbiol Methods* 2000; **39**: 121-126.
25. Ossewaarde JM, Rieffe M, Rozenberg-Arska m, Ossenkoppele PM, Nawrocki RP, and Van Loon AM. Development and clinical evaluation of a polymerase chain reaction test for detection of Chlamydia trachomatis. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 2122-2128.
26. Ossewaarde JM, Veris AD, Bestebroes T, and Angulo AF. Application of a Mycoplasma Group-specific PCR for monitoring decontamination of Mycoplasma-infected Chlamydia sp. Strains. *Applied Environ Microbiol* 1996; **62**(2): 328-331.
27. Razin S, DNA probes and PCR in diagnosis of Mycoplasma infections. *Mol. Cell Probes* 1994; **8**: 497-511.
28. Harasawa R. 1995. Nested PCR: Application to the detection of Mycoplasmas. In Razin, S. and Tully, J. G. Editors.(1995). *Molecular and Diagnostic procedures in Mycoplasmology* (Vol.2) Academic Press, London.
29. Salih BA, Rosenbusch RF. Cross-reactive proteins among eight bovine Mycoplasmas detected by monoclonal antibodies. *Comp. Immunol. Microbial* 2001; **24**: 103-111.
30. Rodriguez F, Fernandez A, Ball HJ. Detection of Mycoplasma mycoides subspecies mycoides by growth-inhibition using monoclonal antibodies. *Res. Vet. Sci*. 1997; **63**: 91-92.
31. Been-Abdelmoumen B, Roy RS. Antigenic relatedness between seven avian Mycoplasma species as recovered by western blot analysis. *Avian Dis*. 1995; **39**: 250-262.
32. Bolske G. Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg*. 1988; **A269**: 331-340.

33. Johansson KE, Johansson I, Gobel UB. Evaluation of different hybridization procedures for the detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Mol. Cell. Probes*. 1990; **4**: 33-42.
34. 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.
35. 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.
36. Grau O, Kovacic R, 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.
37. Kai M, Kamiya S, Yabe H, Takakura I, Shiozawa K, Ozawa A. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 1993; **38**: 166-170.
38. Luneberg E, Jensen JS, Frosch M. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction and non-radioactive hybridization in microtiter plates. *J. Clin. Microbiol*. 1993; **31**: 1088-1094.