

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

مهدیه سادات غیاثی^{۱*}، محمد حسن شاه حسینی^۲، حمید رضا مهاجرانی^۱

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

چکیده

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

روش کار: در این مطالعه ابتدا تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای MGSO و GPO-۱ و هدف ژنی ۱۶SrRNA بهینه گردید. همچنین روش PCR مورد استفاده از لحاظ حساسیت و ویژگی بررسی گردید. سرانجام DNA به روشهای ساده از ۷۲ لاین سلولی استخراج و با PCR آزمایش شد.

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

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

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

مقدمه:

سلول، فراورده های بیولوژیک و مخرب نتایج بیولوژیک به شمار می آیند. (۱) همچنین فاقد دیواره سلولی و شامل فقط یک غشای سلولی، ریبوزومها، وزنومی به اندازه ۵۸۰ kb می باشند. به دلیل سایز کوچک، مایکوپلاسماها می توانند از فیلترهای ۰/۲۲ و ۰/۴۵ μm عبور کنند، فیلترهایی که به طور معمول برای استریل کردن معرف های کشت سلول استفاده می شود.^(۲) مایکوپلاسماها اغلب آلودگی کننده هایی با رشد

مایکوپلاسماها متعلق به کلاس Mollicutes و یکی از کوچکترین میکروارگانیسم های زنده آزاد و توانا در خود تکثیری هستند. این باکتریها از جدیترین آلودگی کننده های کشت

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

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

مواد و روش ها:

سویه های باکتریایی مورد استفاده :

در این مطالعه گونه های متعلق به مولیکوت ها بکار رفته است که عبارتند از مایکوپلاسما پنومونیه (NCTC ۱۰۱۱۹)، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما سینوویه، مایکوپلاسما گالیناروم(رازی ۱۳۵۵ و ۱۳۴۶)، مایکوپلاسما گالیسپتیکوم (رازی ۱۳۵۵)، مایکوپلاسما اوپانومونیه(رازی ۱۳۶۴)، مایکوپلاسما آگالاكتیا(رازی ۱۳۴۳)، اوره آپلاسما اوره آلتیکوم(رازی ۱۳۶۹) و اکولو پلاسما لیدلاوی.

تهییه نمونه ها:

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

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

شناسایی مایکوپلاسما می تواند توسط روش های کشت مستقیم ارگانیسم و روش های غیر مستقیم انجام پذیرد (۲۳، ۵). روش های

آزمون از سوسپانسیون مایکوپلاسما آرجنینی با CFU مشخص، رقت های مختلف تهیه و DNA آنها استخراج و در نهایت آزمون PCR بر روی نمونه های واجد تعداد مشخص انجام شد. آزمون ویژگی هم با استفاده از DNA تعدادی از ارگانیسمها مانند انسان، موش، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سودوموناس آروجینوز، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس انجام پذیرفت.

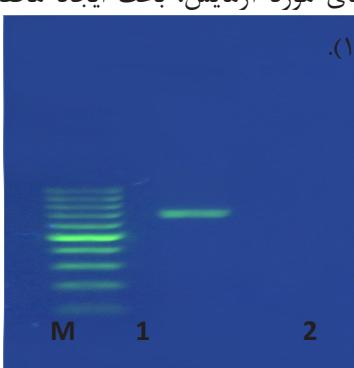
مایکوپلاسما بررسی شده اند.

استخراج DNA

از روش جوشاندن جهت استخراج DNA استفاده شده است. به این ترتیب که $100 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون سلولی به همراه روغنمعدنی در حرارت جوش قرار داده شد و پس از سانتریفیوژ در ۹۰۰۰، مایع رویی بعنوان الگو در تست PCR مورد استفاده قرار گرفت (۲۵).

یافته ها:

در این مطالعه تعداد ۷۲ نمونه شامل رده های سلولی انسانی (مانشیمال و خونساز) و اجزاء محیط کشت بررسی شد، که در ۸/۵٪ از نمونه های مورد بررسی (۶ مورد) آلودگی با مایکوپلاسما مشخص گردید. با تست بررسی حساسیت آزمون نشان داده شد که پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه دارای حساسیتی برابر 10 CFU و از ویژگی بالایی برای شناسایی مایکوپلاسماها برخوردار می باشند. بکار بردن روش جوشاندن جهت استخراج DNA بجای کیت های تجاری از مزایای دیگر این تحقیق می باشد، که روشی سریع و ساده است و با امکانات پایین و انجام پذیر می باشد. با استفاده از پرایمرهای GPO-1, MGSO و DNA انواع مایکوپلاسماها مانند مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما آرجنینی، مایکوپلاسما هیورومنیس، مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما لیدولای، اوره آپلاسما اوره الیتیکوم، تکنیک PCR بهینه سازی گردید. این تست PCR با تمام مایکوپلاسماهای مورد آزمایش، باعث ایجاد محصول 715 bp گردید (شکل ۱).



شکل ۱. تست بهینه سازی شده PCR با استفاده از پرایمرهای GPO-1, MGSO : ستون M سایز مارکر 100 bp DNA Ladder (فرمانتاس)، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲ کنترل منفی (آب مقطر) (آگارز ۱/۵٪ و

سکانس نوکلئوتیدی پرایمرها

سکانس پرایمرها مورد استفاده به شرح زیر می باشند:

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

شرایط PCR

ترکیبات لازم جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر به ترتیب زیر تهیه گردید. ۵ میکرولیتر از DNA الگو (template)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای جلویی و عقبی، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ($10 \times$) (سیناکلون)، $75 \mu\text{l}$ میکرولیتر MgCl_2 با غلظت 50 mM (سیناکلون)، $4 \mu\text{l}$ میکرولیتر مخلوط dNTP (10 mM) (سیناکلون) و $14 \mu\text{l}$ میکرولیتر از آنزیم Taq (سیناکلون) و $1 \mu\text{l}$ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل دیونیزه جهت به حجم رساندن استفاده گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده و اپتیمازیز شده عبارت بود از: حرارت 93°C درجه سانتی گراد 20 ثانیه، 60°C درجه سانتی گراد 20 ثانیه، و در نهایت 72°C درجه سانتی گراد 30 ثانیه که طی 40 سیکل عمل تکثیر انجام گردید. محصول PCR با سایز مورد نظر (715 bp)، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، بر روی ژل آگاروز $1/5 \text{ %}$ درصد و با استفاده از اتیدیوم برو ماید و نور UV در دستگاه ترانس ایلومینیتور بررسی گردید.

حساسیت و ویژگی آزمون:

جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده در این

باferX.۰.۵). TBE

مايكوپلاسما آرجنینی)، ستون ۲: DNA انسان، ستون ۳: DNA موش،

ستون ۴: مايكوباكتریوم توبرکلوزیس، ستون ۵: سودوموناس آئروجینوزا،

ستون ۶: استافیلوکوکوس اورئوس، ستون ۷: سالمونلا تیفی، ستون ۸: کنترل

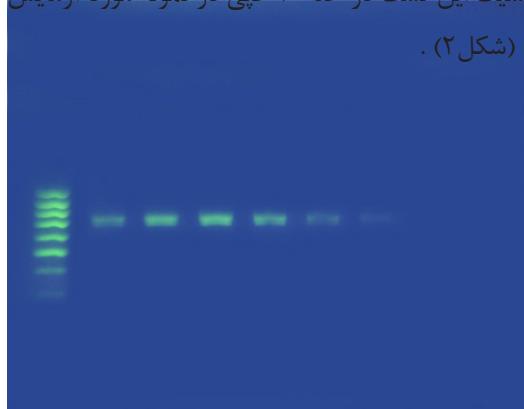
منفی (آگارز ۲٪ و باferX.۰.۵)

آلودگی مايكوپلاسما در ۷۲ نمونه شامل رده های سلولی مختلف (رده های مزانشیمال و خونساز) و اجزاء محیط کشت بوسیله PCR مخصوص جنس جستجو شد. از این تعداد، ۶ نمونه آلوده (۰.۸/۵٪)، از طریق تکثیر قطعه صحیح، تشخیص داده شد.

بحث

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

ارزیابی حساسیت آزمون از طریق رقیق سازی کشت مايكوپلاسما با واحد سازنده کلنی مشخص انجام پذیرفت. نشان داده شد که حساسیت این تست در حد ۱۰ کپی در نمونه مورد آزمایش می باشد (شکل ۲).



M 1 2 3 4 5 6 7 8

شکل ۲. تست بررسی حساسیت آزمون PCR بهینه شده: ستون M سایز مارکر ۱۰۰ bp DNA Ladder (فرمنتانس)، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲ 10^6 CFU، ستون ۳ 10^5 CFU، ستون ۴ 10^4 CFU، ستون ۵ 10^3 CFU، ستون ۶ 10^2 CFU، ستون ۷ ۱ CFU، ستون ۸ کنترل منفی (آگارز ۲٪ و باferX.۰.۵).

با انجام آزمون ویژگی، مشخص گردید که پرایمرهای مورد استفاده هیچ محصول ناخواسته ای با DNA باكتریهای غیر مايكوپلاسمایی مانند مايكوباكتریوم توبرکلوزیس، سودوموناس، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و همینطور انسان و موش ایجاد نکردند (شکل ۳).

M 1 2 3 4 5 6 7 8
88888888 8

شکل ۳ . تست آزمون ویژگی PCR بهینه شده. ستون M: سایز مارکر DNA ۱۰۰ bp DNA Ladder (فرمنتانس)، ستون ۱: کنترل مثبت (DNA

مايكوپلاسما می باشد، که با توجه به گونه مايكوپلاسمای بررسی شده، نوع و طراحی پرایمر، هدف ژنی و شرایط PCR متفاوت است(۲۱،۱۲،۴). بدین ترتیب بخش های ثابت و مشترک ژن ۱۶SrRNA را به عنوان سکانس هدف انتخاب گردید. گزینش این سکانس به دلیل تکرار آن در طول ژنوم و نیز ثابت و مشترک بودن آنها در بین اعضاء مولیکوت ها هست. از دیگر ویژگی های این مطالعه روش استخراج DNA می باشد، که به روش ساده جوشاندن انجام پذیرفته است. این روش بدليل سادگی، سریع بودن و زمان کم و علاوه بر آن عدم استفاده از مواد شیمیایی مثل فل- کلروفرم و مواد دیگر جهت استخراج DNA ، از ویژگیهای منحصر بفردی برخوردار است. آلودگی مايكوپلاسما یکی از فاکتورهای مهم تحدید کننده کشت سلول و فراورده های بیولوژیک می باشد، که ویژگی های بیولوژیکی سلول را تحت تاثیر قرار می دهد. از این رو بکاربردن روشی مناسب برای شناسایی مايكوپلاسماهای بسیار مهم است. زیرا روش های مرسوم به علت محدودیت از نظر صرف وقت زیاد، حساسیت کم و داشتن مهارت، دارای ویژگی های لازم جهت تشخیص مايكوپلاسماهای در کشت سلول و فراورده های بیولوژیکی نمی باشند. اما روش های مولکولی بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) به دلیل ویژگی های ذاتی آن از اهمیت بسزایی برخوردارند. نتایج مشاهده شده در این مطالعه مبتنی بر دقیق و سرعت و حسایت و ویژگی بالای تکنیک PCR بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک در ۱۶SrRNA جهت تشخیص آلودگی مايكوپلاسما در کشت سلول و فراورده های بیولوژیک می باشد.

سپاسگزاری:

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

منابع :

- [1] Barile MF Mycoplasma-tissue cell culture

مشکل می باشد (۲۸،۲۶،۱۲). از میان تکنیک های بکار برده شده در تشخیص مايكوپلاسما که شامل روش مولکولی PCR ، روش های رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلوروکروم و بیوشیمیابی است، مشخص شده است که تکنیک PCR روشی حساس، سریع و با ویژگی بالا می باشد (۲) روش های کشت میکروبی به زمان ۴-۱۵ هفتگه ای در آزمایشگاه نیازمند هستند. در ضمن هنوز تعدادی از سویه های مايكوپلاسما وجود دارند که در کشت های میکروبی غیر قابل رشد و یا به سختی مانند مايكوپلاسما هیورونیس رشد می کنند(۲). داشتن یک روش سریع و حساس برای تشخیص آلودگی مايكوپلاسما در کشت سلول و فرآورده های بیولوژیک از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. این روش باید توانایی شناسایی ۵ گونه تیپیک مايكوپلاسماهای آلودگه کننده کشت سلول را داشته باشد که شامل مايكوپلاسما هیورونیس، مايكوپلاسما آرجینینی، مايكوپلاسما ارال، مايكوپلاسما فرمانتانس، اکولوپلاسما لیدولای هستند که عامل بیش از ۹۵٪ آلودگی ها در کشت سلولی و فرآورده های بیولوژیک می باشند. و به علاوه باید قادر به شناسایی سایر گونه های آلودگه کننده نیز باشند.

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

هدف اصلی از این بررسی رسیدن به یک روش قابل اعتماد و سریع جهت شناسایی مايكوپلاسما در کشت های سلولی و نیز در سرم های حیوانی و فرآورده های بیولوژیک است. در این مطالعه که بر مبنای واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) طراحی گردید توانستیم به حداقل حساسیت ۱۰ کپی از مولکول DNA هدف رسیده و همچنین هیچ واکنش متقاطعی با DNA ژنومیک دیگر ارگانیسم های مورد آزمایش مثل سودوموناس اتروجینوزا، انسان، مايكوباكتريوم توبرکلوزیس و استافيلوكوكوس اورئوس دیده نشد. اما در بعضی مطالعات حد شناسایی بین ۱-۱۰۰ دیده شد.

- interactions. In: *The Mycoplasmas* (Tully GJ, Whitcomb RF, eds.). Academic Press, New York, 1979, 425–474.
- [2] Been-Abdelmoumen B, Roy RS Antigenic relatedness between seven avian Mycoplasma species as recovered by western blot analysis. *Avian Dis*, 1995, 39, 250–262.
- [3] Bonissol C, Traincard F, Stoiljkovic B, Hosli P Adenosine phosphorylase activity as a technique for detection of Mycoplasmas in biological media. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 1984, 135A, 63–72.
- [4] Buck GE, Ohara LC, Summersgill JT Rapid sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol*, 1992, 30, 3280–3283.
- [5] Dussurget O, Dussiox DR Rapid and sensitive PCR-based detection of Mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60, 953–959.
- [6] Eldering JA, Felton C, Veillux A, Potts BJ Development of a PCR method for *Mycoplasma* testing of chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals*, 2004, 32, 183–193.
- [7] Grau O, 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.
- [8] Hart MK, Delgiudice RA, Korch GW Absence of *Mycoplasma* contamination in the anthrax vaccine. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8, 94–96.
- [9] Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K Detection and tentative identification of dominant *Mycoplasma* species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Res Microbiol*, 1993, 144, 489–493.
- [10] Harasawa R Nested PCR: Application to the detection of Mycoplasmas. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmatology* (Razin, S. and Tully, J.G., eds.). Academic Press London, 1995, 235–250.
- [11] Jurmanova K, Hajkova M, Fischer O Detection of Mycoplasmas in cell cultures. *Zent Bakteriol Parasit Infekt*, 1990, 20, 947–948.
- [12] Kai M, Kamiya S, Yabe H, Takakura I, Shiozawa K Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples by the polymerase chain reaction. *J Med Microbiol*, 1993, 38, 166–170.
- [13] Kong F, James G, Gordon S, Zelinski A, Gilbert GL Species-specific PCR for identification of common contaminant Mollicutes in cell culture. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67, 3195–3200.
- [14] Loens K, Uris D, Goossens H, Ieven M Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*, 2003, 41, 4915–492.
- [15] Mardassi BB, Mohamad RB, Gueriri I, Boughattaas S, Mlik B Duplex PCR to differentiate between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 948–958.
- [16] McGarry GJ, Kotani H, Butler GH Mycoplasmas and tissue culture cells. In: Manillof, J., McElhaney, N., Finch, L.R. and Baseman, J.B, *Mycoplasmas, Molecular Biology and Pathogenesis*. Am Soc Microbiol, 1992, 445–454.
- [17] Quirk JT, Kupinski JM, Dicioccio RA Detection of *Mycoplasma* ribosomal DNA sequences in ovarian tumors by nested PCR. *Gynecol Oncol*, 2001, 83, 560–562.
- [18] Rawadi Gd, Dussurget O Advances in PCRbased detection of *Mycoplasmas* contaminating cell cultures. *PCR methods Appl*, 1995, 4, 199–208.
- [19] Razin S DNA probes and PCR in diagnosis of *Mycoplasma* infections. *Mol Cell Probes*, 1994, 8, 497–511.
- [20] Sung Hb, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB PCR-based detection of *Mycoplasma* species. *J Microbiol*, 2006, 44, 42–49.
- [21] Spaepen M, Angulo AF, Marynen P, Cassiman JJ Detection of bacterial and *Mycoplasma* contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 99, 89–94.
- [22] Sperger J, Rosengarten R Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. *Vet Microbiol*, 2007, 125, 170–174.
- [23] Stakenborg T, Vicca J, Verhelst R, Butaya P, Maes D Evaluation of tRNA gene PCR for identification of Mollicutes. *J Clin Microbiol*, 2005, 43, 4558–4566.
- [24] Tang J, Hu M, Lee S, Robin RA Polymerse chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/ Acholeplasma* contaminants in cell culture. *J Microbiol Methods*, 2000, 39, 121–126.
- [25] 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, 907–914.
- [26] Uphoff CC, Brauer S, Grunicke D, Gignac SM, Macleod R Sensitivity and specificity of five different *Mycoplasma* detection assays. *Leuk Res*, 1992, 6, 335–341.
- [27] Uphoff CC, Drexler HG Comparative PCR analysis for detection of *Mycoplasma* infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2002, 38, 79–85.
- [28] Van-kuppeveld FJ, Van-der-logt JT, Angulo AF, Van-Zoest MJ, Quint WG Genus- and speciesspecific identification of *Mycoplasmas* by 16S Rrna amplification. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58, 2606–2615.
- [29] Wang H, Kang F, Jelfs P, James G, Gilbert GL Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mollicutes strain by reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70, 1483–1486.
- [30] Woubit S, Manso-Silvan L, Lorenzon S, Gaurivaud P, Poumarat F A PCR for the detection of mycoplasmas belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster: Application to the diagnosis of contagious agalactia. *Mol Cell Probes*, 2007, 21, 391–399.