

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

مهديه سادات غیائی^{۱*}، محمد حسن شاه حسینی^{۲،۳}، حمید رضا مهاجرانی^۴

(۱) دانشگاه علوم تحقیقات اراک، گروه میکروبیولوژی، اراک-ایران
(۲) دکتری تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد واحد شهر قدس
(۳) دکتری تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات اراک
(۴) موسسه ایرانیان ژن فناوری، تهران- ایران

چکیده

سابقه و هدف: آلودگی لاین های سلولی و فراورده های بیولوژیکی یکی از مشکلات عمده تکنیک کشت سلولی می باشد. تشخیص سریع و دقیق آلودگی مایکوپلازما قسمت مهمی از کنترل آزمایشگاه های کشت سلول است، و باید روشی در هر آزمایشگاه کشت سلول وجود داشته باشد. سلول های آلوده منتهی به نتایج غیر قابل اطمینان می شود، بنابراین نیاز به یک روش مطمئن در آزمایشگاه امری ضروری می باشد. واکنش زنجیره ای پلیمرز یک تکنیک سریع، حساس و با ویژگی بالا در تشخیص باکتریها به شمار می رود. هدف از این مطالعه بررسی کارایی 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 روشی ساده از ۷۲ لاین سلولی استخراج و با PCR آزمایش شد.

یافته ها: محصول ۷۱۵ جفت بازی توسط پرایمرها تکثیر و از طریق تعیین توالی تأیید گردید. در بررسیهای ویژگی، با هیچکدام از DNA های تست شده محصولی 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 مایکوپلازما در کشت های سلولی و فراورده های بیولوژیک از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار می باشد.

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

مقدمه:

سلول، فراورده های بیولوژیک و مخرب نتایج بیولوژیک به شمار می آیند. (۱، ۲۸، ۲۰، ۶)، همچنین فاقد دیواره سلولی و شامل فقط یک غشای سلولی، ریبوزومها، و ژنومی به اندازه ۵۸۰ kb می باشند. به دلیل سایز کوچک، مایکوپلازماها 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. (۱۴، ۲۶). مایکوپلازماها اغلب آلوده کننده هایی با رشد

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

آدرس نویسنده مسئول: خیابان بنیاد، مرکز درمان ناباروری جهاد

دانشگاهی قم، آزمایشگاه سلول های بنیادی

Email: Mahdieh.ghiasi@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱

آهسته می باشند که به طور معمولی به تعداد کم وجود دارند، اما ممکن هست باعث ایجاد مشکلاتی در کشت سلول شوند. آلودگی 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 (۳،۱۴،۲۱،۲۶،۲۷). منشأ آلودگی بیشتر کشت های سلولی حیوانی، مایکوپلاسمها شناخته شده اند (۱۵). آلودگی کشت های سلولی با مایکوپلاسمها مشکلی هست که در میان بیشتر آزمایشگاه های کشت سلول دیده می شود. آلودگی ممکن است برای مدت طولانی ناشناخته باقی بماند، و تکثیر سلول، بیان ژن، و پاسخ های دیگر سلول را تحت تاثیر قرار دهد. شناسایی آلودگی قسمت مهمی از کنترل کیفی آزمایشگاه های کشت سلول می باشد (۲۶). آلودگی های مایکوپلاسم در کشت های سلولی مورد استفاده در امر تحقیقات مشکلات بسیاری را ایجاد می نمایند. در بیشتر نمونه ها شناسایی چشمی این آلودگی یا شناسایی میکروسکوپی آن غیر ممکن هست. اگر چه مایکوپلاسم آسیب قابل مشاهده ای را در سلول ها سبب نمی شود، اما مسلماً 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 آلوده شده در بانک های سلولی بین ۱۰٪ تا ۸۵٪ می باشد. آلودگی مایکوپلاسم می تواند از سرم گاوی، پرسنل آزمایشگاه، کشت های آلوده دیگر، یا از حیواناتی که سلول ها از آنها گرفته شده است، قابل انتقال باشد (۲۰،۲۹). بیشترگونه های مایکوپلاسم که در کشت های سلولی آلوده شناسایی شده اند عبارتند از: مایکوپلاسم فرمنتانس (*Mycoplasma fermentans*)، مایکوپلاسم هیورینیس (*Mycoplasma hyorinis*)، مایکوپلاسم آرجنینی (*Mycoplasma arginini*)، مایکوپلاسم ارال (*Mycoplasma orale*)، اکولپلاسم لیدولای (*Achoplasma laidlawi*) (۸،۲۲،۳۰).

شناسایی مایکوپلاسم می تواند توسط روش های کشت مستقیم ارگانیسیم و روش های غیر مستقیم انجام پذیرد (۲۳،۵). روشهای

غیر کشتی شامل: (۱) رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلورسنت (۲) دو رگه سازی اسید نوکلئیک (۳) تستهای بیوشیمیایی و واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR می باشد (۵،۸،۲۰،۲۲،۲۹). واکنش زنجیره ای پلیمرز یک روش بسیار حساس بوده و تکنیک مناسبی جهت تشخیص مایکوپلاسم در کشت سلول می باشد. مقایسه روش PCR با دیگر روشها (هیبریدیزاسیون DNA/RNA و کشتهای میکروبی) مشخص می کند که روش PCR یک متد سریع و قابل اعتماد برای شناسایی مایکوپلاسم هست (۲۶،۲۷). یکی از مراحل 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 ترادف های حفظ شده و مشترک در بین مایکوپلاسمها می باشد (۹،۱۳،۱۷،۲۴). هدف این مطالعه شناسایی جنس مایکوپلاسم در نمونه های کشت سلولی و نیز فراورده های بیولوژیکی از طریق روش مولکولی بر پایه PCR و سکانسهای 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 مایکوپلاسم پنومونیه (NCTC ۱۰۱۱۹)، مایکوپلاسم آرجنینی، مایکوپلاسم هیورینیس، مایکوپلاسم ارال، مایکوپلاسم سینوویه، مایکوپلاسم گالیناروم (رازی ۱۳۵۰ و ۱۳۴۶)، مایکوپلاسم گالیسپتیکوم (رازی ۱۳۵۵)، مایکوپلاسم اویاپنومونیه (رازی ۱۳۶۴)، مایکوپلاسم آگالاکتیا (رازی ۱۳۴۳)، اوره آپلاسم اوره آلیتیکوم (رازی ۱۳۶۹) و اکولو پلاسم لیدولای.

تهیه نمونه ها:

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

مایکوپلازما بررسی شده اند.

استخراج DNA

از روش جوشاندن جهت استخراج DNA استفاده شده است. به این ترتیب که ۱۰۰ µl از سوسپانسیون سلولی به همراه روغن معدنی در حرارت جوش قرار داده شد و پس از سانتریفوژ در ۹۰۰۰g، ۱۲۰۰۰، مایع رویی بعنوان الگو در تست PCR مورد استفاده قرار گرفت (۲۵).

سکانس نوکلئوتیدی پرایمرها

سکانس پرایمرها مورد استفاده به شرح زیر می باشد:

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

شرایط PCR

ترکیبات لازم جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز 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 (۱۰X) (سیناکلون)، ۰/۷۵ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت ۵۰ mM (سیناکلون)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰mM) (سیناکلون) و ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم Taq (سیناکلون) و ۱۴ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل دیونیزه جهت به حجم رساندن استفاده گردید. برنامه حرارتی مورد استفاده و ایتیمایز شده عبارت بود از: حرارت ۹۳ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه، و در نهایت ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه که طی ۴۰ سیکل عمل تکثیر انجام گردید. محصول PCR با سایز مورد نظر (۷۱۵ جفت باز)، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ درصد و با استفاده از اتیدیوم برو ماید و نور UV در دستگاه ترانس ایلومینیتور بررسی گردید.

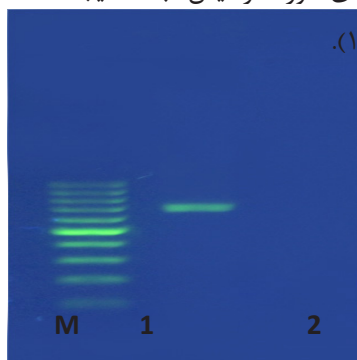
حساسیت و ویژگی آزمون:

جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده در این

آزمون از سوسپانسیون مایکوپلازما آرجینی با CFU مشخص، رقت های مختلفی 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 ارگانیسرها مانند انسان، موش، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سودوموناس آئروجینوزا، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس انجام پذیرفت.

یافته ها:

در این مطالعه تعداد ۷۲ نمونه شامل رده های سلولی انسانی (مزانسیمال و خونساز) و اجزاء محیط کشت بررسی شد، که در ۸/۵٪ از نمونه های مورد بررسی (۶ مورد) آلودگی با مایکوپلازما مشخص گردید. با تست بررسی حساسیت آزمون نشان داده شد که پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه دارای حساسیتی برابر ۱۰ CFU و از ویژگی بالایی برای شناسایی مایکوپلازماها 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 MGSO-۱، GPO-۱ و DNA انواع مایکوپلازماها مانند مایکوپلازما پنومونیه، مایکوپلازما آرجینی، مایکوپلازما هیورونیس، مایکوپلازما ارال، مایکوپلازما لیدولای، اوره آپلازما اوره الیتیکوم، تکنیک PCR بهینه سازی گردید. این تست PCR با DNA تمام مایکوپلازماهای مورد آزمایش، باعث ایجاد محصول ۷۱۵bp گردید (شکل ۱).



شکل ۱. تست بهینه سازی شده PCR با استفاده از پرایمرهای GPO-۱، MGSO: ۱: ستون M سایز مارکر DNA Ladder ۱۰۰bp (فرمنتاس)، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲ کنترل منفی (آب مقطر) (آگارز ۱/۵٪ و

بافر ۰.۵X TBE).

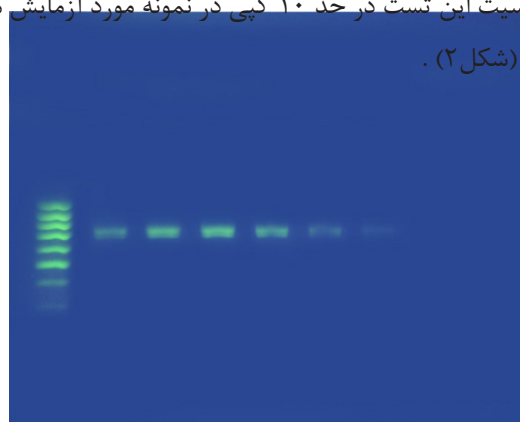
مایکوپلازما آرجینی)، ستون ۲: DNA انسان، ستون ۳: DNA موش، ستون ۴: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ستون ۵: سودوموناس آئروجینوزا، ستون ۶: استافیلوکوکوس اورئوس، ستون ۷: سالمونلا تیفی، ستون ۸: کنترل منفی (آگارز ۲٪ و بافر ۰.۵X TBE)

آلودگی مایکوپلازما 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 (۸/۵٪)، از طریق تکثیر قطعه صحیح، تشخیص داده شد.

بحث

مایکوپلازماها از ارگانیسم های غیر قابل رویت با میکروسکوپیهای نوری و همچنین کوچکترین باکتریهای خودتکثیر پلئومورف، با قطری حدود ۵۰۰-۲۰۰ نانومتر، و فاقد دیواره سلولی می باشند. بدلیل داشتن اندازه کوچک و ویژگی انعطافی، این باکتریها 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 مایکوپلازما 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 هوخست و DAPI)، کشت در محیط های کشت و روش های مولکولی قابل انجام می باشد (۱۰،۱۹). روشهای مختلفی برای تشخیص مایکوپلازما در کشت سلول و فرآورده های بیولوژیک به کار برده می شود. در بسیاری از مطالعات از ترکیب دو روش جهت شناسایی مایکوپلازما 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 باشند (۹،۱۳،۲۳). همچنین در مطالعه ی 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 باکتریایی

ارزیابی حساسیت آزمون از طریق رقیق سازی کشت مایکوپلازما 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 DNA Ladder ۱۰۰ bp (فرمنتاس)، ستون ۱ کنترل مثبت، ستون ۲ CFU ۱۰^۶، ستون ۳ CFU ۱۰^۵، ستون ۴ CFU ۱۰^۴، ستون ۵ CFU ۱۰^۳، ستون ۶ CFU ۱۰^۲، ستون ۷ CFU ۱، ستون ۸ کنترل منفی (آگارز ۱/۵٪ و بافر ۰.۵X TBE).

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



M 1 2 3 4 5 6 7 8
8888888 8

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

مشکل می باشد (۱،۲،۱۶،۲۶،۲۸). از میان تکنیک های بکار برده شده در تشخیص مایکوپلازما که شامل روش مولکولی PCR، روش های رنگ آمیزی DNA با رنگ های فلوروکروم و بیوشیمیایی است، مشخص شده است که تکنیک PCR روشی حساس، سریع و با ویژگی بالا می باشد (۲) روش های کشت میکروبی به زمان ۴-۱ هفته ای در آزمایشگاه نیازمند هستند. در ضمن هنوز تعدادی از سویه های مایکوپلازما وجود دارند که در کشت های میکروبی غیر قابل رشد و یا به سختی مانند مایکوپلازما هیورونیس رشد می کنند (۲). داشتن یک روش سریع و حساس برای تشخیص آلودگی مایکوپلازما در کشت سلول و فرآورده های بیولوژیک از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. این روش باید توانایی شناسایی ۵ گونه تیپیک مایکوپلازماهای آلوده کننده کشت سلول را داشته باشد که شامل مایکوپلازما هیورونیس، مایکوپلازما آرجینی، مایکوپلازما ارال، مایکوپلازما فرمنتانس، اکولوپلازما لیدولای هستند که عامل بیش از ۹۵٪ آلودگی ها در کشت سلولی و فرآورده های بیولوژیک می باشند. وبه علاوه باید قادر به شناسایی سایر گونه های آلوده کننده نیز باشند.

در این مطالعه سعی شده است با استفاده از روشی مولکولی و حساس، به شناسایی مایکوپلازماهای آلوده 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 مایکوپلازماها، به عنوان یک هدف ژنی مناسب جهت تشخیص این آلوده 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 مایکوپلازما در کشت های سلولی و نیز در سرم های حیوانی و فرآورده های بیولوژیک است. در این مطالعه که بر مبنای واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) طراحی گردید توانستیم به حداقل حساسیت ۱۰ کپی از مولکول DNA هدف رسیده و همچنین هیچ واکنش متقاطع با DNA ژنومیک دیگر ارگانیسم های مورد آزمایش مثل سودوموناس اتروجینوزا، انسان، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و استافیلوکوکوس اورئوس دیده نشد. اما در بعضی مطالعات حد شناسایی بین ۱-۱۰۰

مایکوپلازما می باشد، که با توجه به گونه مایکوپلازماهای بررسی شده، نوع و طراحی پرایمر، هدف ژنی و شرایط PCR متفاوت است (۴،۷،۱۲،۲۱). بدین ترتیب بخش های ثابت و مشترک ژن ۱۶ SrRNA 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 بدلیل سادگی، سریع بودن و زمان کم و علاوه بر آن عدم استفاده از مواد شیمیایی مثل فنل- کلروفرم و مواد دیگر جهت استخراج DNA، از ویژگیهای منحصر بفردی برخوردار است. آلودگی مایکوپلازما یکی از فاکتورهای مهم تحدید کننده کشت سلول و فرآورده های بیولوژیک می باشد، که ویژگی های بیولوژیکی سلول را تحت تاثیر قرار می دهد. از این رو بکاربردن روشی مناسب برای شناسایی مایکوپلازماها 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 مایکوپلازماها در کشت سلول و فرآورده های بیولوژیکی نمی باشند. اما روش های مولکولی بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) به دلیل ویژگی های ذاتی آن از اهمیت بسزایی برخوردارند. نتایج مشاهده شده در این مطالعه مبتنی بر دقت و سرعت و حساسیت و ویژگی بالای تکنیک PCR بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک در ۱۶SrRNA جهت تشخیص آلودگی مایکوپلازما در کشت سلول و فرآورده های بیولوژیک می باشد.

سپاسگزاری:

از مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری 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

- 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 Mycoplasmaology (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 Bakteriell 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, Zelynski 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] McGarrity 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 PCR based 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] Spargser 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 Polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/ Acholeplasma contaminants in cell culture. J Microbiol Methods, 2000, 39, 121–126.
- [25] Timenetsy J, Santos LM, Buzinhani M, Mettifofo 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 species-specific identification of Mycoplasmas by 16S Rna 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.